Reinigung und Charakterisierung der dialysablen Thymusfaktoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Nikolaus Wilhelm
aus Langenau

1978

Reinigung und Charakterisierung der dialysablen Thymusfaktoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Nikolaus Wilhelm
aus Langenau

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	23.8.1978
Dekan	Prof.Dr.W.Zeil
1. Berichterstatter	Prof.Dr.F.A.Anderer
2. Berichterstatter	Prof.Dr.U.Weber

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 1975 bis Juni 1978 am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. F. A. Anderer durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. A. Anderer für die Stellung des Themas und für die ständige und effektive Beratung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Experimente.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536511_0031

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	1
B) Ergebnisse	5
I Das biologische Testsystem	5
a) Allgemeines	5
b) Malignität der STU-D17-Zellen	7
c) Meßgenauigkeit der biologischen Kriterien	10
d) Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	12
e) Abschließendes	12
II Präparation der aktiven Fraktionen aus Thymus	13
a) Definition der spezifischen Aktivität	13
b) Thymusaufbereitung	14
c) Dialyse	15
d) Gelpermeation mit Biogel P2	21
e) Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2	27
f) Entsalzung mit Dowex 50 WX 2	29
III Alternativer Trennungsgang	36
a) Homogenisation und Dialyse	37
b) Gelpermeation mit Biogel P2 und Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2	39
IV Biochemische und enzymatische Charakterisierung der aktiven Fraktionen	43
V Weitere Reinigungsversuche und biochemische Charakterisierung der aktiven Fraktionen	62

Seite

a) Gelpermeation mit Biogel P2 und 1 M Kochsalz im Puffer 62

b) Präparative Dünnschichtchromatographie 69

C) Diskussion 80

D) Zusammenfassung 88

E) Material, Geräte und Methoden 90

F) Literaturliste 94

A) Einleitung

Die immunologische Forschung in den beiden letzten Jahrzehnten hat gezeigt, daß der Thymus bei den Säugetieren eine wichtige Rolle spielt, was die Erstellung und Erhaltung der Immunkompetenz betrifft. Hierbei lassen sich grundsätzlich zwei Aufgabengebiete voneinander abgrenzen. Einerseits werden vom Thymus zelluläre Faktoren ins Immunsystem entsandt, zum anderen produziert das Organ eine Reihe humoraler Faktoren, die das Immunverhalten des Gesamtorganismus beeinflussen.
Die erstere Aufgabe des Thymus wird dadurch erfüllt, daß er die sogenannten T-Lymphozyten für den peripheren Pool zur Verfügung stellt (1-4). Knochenmarks-Stammzellen wandern in den Thymus ein, teilen sich mehrfach und differenzieren schließlich zu Thymozyten. Als solche bleiben sie dann eine zeitlang im Thymus, um nach Umwandlung zu T-Lymphozyten in die Peripherie ausgeschleust zu werden. Im Immunsystem sind sie dann für "Graft-versus-Host" Reaktionen (Transplantatabstoßung) in vivo verantwortlich (5-6), im weiteren Sinne auch für die Hypersensitivität vom verzögerten Typ (7-8), als Helfer-Zellen wirken sie bei der Bildung von zellgebundenen und löslichen Antikörpern mit (9-10) und als Suppressor-Zellen sorgen sie für die Unterdrückung der Antikörperproduktion (11-12).
Welcher Art die Einwirkung des Thymus auf die Vorläuferzellen bei ihrer Differenzierung zu Thymozyten ist, läßt sich noch nicht genau sagen. Da der Vorgang sich normalerweise im Thymus selbst abspielt, könnte ein unmittelbarer Kontakt zwischen Vorläuferzelle und Thymusepithelzelle vonnöten sein. Pflanzt man jedoch thymektomierten Tieren Thymusgewebe ein, das in Millipore Diffusionskammern eingeschlossen ist, so ersetzt

ein solches Transplantat zumindest teilweise das eigene Organ (13-15). Es werden wieder Antikörper gegen thymusabhängige Antigene gebildet und das sogenannte "wasting disease" tritt nicht auf. Dies bedeutet, daß im Thymus diffundierbare Substanzen gebildet werden, die ihre Wirkung außerhalb des Organs erzielen können. Tatsächlich wurden aus Thymushomogenaten auch schon eine Reihe löslicher Faktoren isoliert, die in vitro in der Lage sind, Knochenmarkszellen zu Zellen umzuwandeln, die Eigenschaften von T-Lymphozyten besitzen, wie zum Beispiel Oberflächenantigene, Reaktivität in der gemischten Lymphozyten Reaktion oder Rosettenbildung mit Schafserythrozyten. Diese Thymusfaktoren sind: a) "Thymic humoral Factor" nach N.Trainin (THF) (16-18), b) "Thymosin" nach A.L.Goldstein (18-20), c) "Thymopoietin" nach G.Goldstein (21-23) sowie d) der im Serum kreisende "Serum thymic Factor" nach J.F.Bach (18,24,25). Unter der Leitung von Professor F.A.Anderer wurde ein weiterer Thymusfaktor in Angriff genommen, bei dem zwar keine in vitro Differenzierungsversuche durchgeführt wurden, der jedoch in der Lage war, neonatal thymektomierten Mäusen ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung, sowie die Fähigkeit zur Transplantatabstoßung zurückzugeben (26-28). Alle diese aus dem Thymus stammenden Faktoren werden auch als Thymushormone bezeichnet und weisen den Thymus als endokrines Organ aus.

Da der Thymus bei der Bereitstellung der T-Lymphozyten für das Immunsystem eine Hauptrolle spielt, ist er natürlich auch unbedingte Voraussetzung für die Abstossung von Fremdgewebe. Ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Transplantatabstoßung wirkt jedoch auch bei der Immunantwort auf Tumorgewebe (29). Tumorregression kann nur stattfinden, wenn die zelluläre Immunreaktion stimuliert ist. Cytotoxische Antikörper spielen dagegen kaum eine Rolle (29). Wie bei der Abstoßung

allogener Transplantate sind auch bei einer erfolgreichen Tumorregression praktisch nur Lymphozyten in Zusammenarbeit mit Makrophagen erfolgreich, ersichtlich daran, daß diese Zellen sich dann um den Tumor versammeln, in ihn eindringen und schließlich auflösen.
Es war lange Zeit nicht verständlich, daß der Mechanismus der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem in all den Fällen nicht funktioniert, in denen progressives Tumorwachstum auftritt, obwohl Tumorzellen stets Tumorspezifisches-Transplantations-Antigen (TSTA) besitzen und obwohl dieses Antigen stets dazu führt, daß in vitro zelluläre Immunität nachgewiesen werden kann (29). Schließlich fand man jedoch, daß humorale Antikörper sogar in der Lage sind, das Wachstum von Tumoren zu beschleunigen (30,31). Dieser Mechanismus läuft so ab, daß die Antikörper mit dem TSTA auf den Oberflächen der Tumorzellen binden und so zu einer Ummantelung führen, die sie dem Angriff der zellulären Immunreaktion unzugänglich macht. Die betreffenden Antikörper müssen nicht-toxisch oder nur schwach toxisch sein (32,33).
Zur medizinischen Bekämpfung von Tumoren wäre es nun sicher erfolgversprechend, das Verhältnis zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort zu verändern und zwar zu Gunsten der letzteren oder zumindest die Bildung cytotoxischer Antikörper anzuregen.
Es besteht also großes Interesse daran, Faktoren zu finden, die die humorale Immunantwort zurückdrängen, möglichst unter gleichzeitiger Stimulierung der zellulären Immunantwort. In der vorausgegangenen Diplomarbeit (28) wurde zum ersten Mal ein Thymusfaktor aus Kalbsthymus, der vorher nur in Thymektomie-Versuchen eingesetzt worden war, dazu benutzt, das Wachstum von Tumortransplantaten zu beeinflussen. Da hierbei sowohl Wachstumsbeschleunigung als auch Hemmung beobachtet worden war, lag es nahe, den Faktor, der noch ein

komplexes Substanzgemisch darstellte, in dieser Hinsicht weiter zu untersuchen.
Für die vorliegende Arbeit wurde somit die folgende Aufgabenstellung gewählt:

1.) Die aktive(n) Komponente(n) des Extrakts aus Kalbsthymus sollte(n) so weit als möglich gereinigt werden. Hierzu sollte ein geeigneter Trennungsgang entwickelt werden.
2.) Es sollte eine biochemische Charakterisierung der Zwischenstufen und des Endproduktes erfolgen.
3.) Die biologische Aktivität sollte anhand der Beeinflussung des Wachstums von Tumortransplantaten gemessen und charakterisiert werden. Hierbei sollte Wert auf ein Testsystem gelegt werden, das große Vergleichsreihen in vivo erlaubt.

B) Ergebnisse

I Das biologische Testsystem

a) Allgemeines

Das biologische Testsystem war ein reines in vivo System. Gemessen wurde grundsätzlich die Geschwindigkeit, mit der eine kritische Dosis in vitro gezüchteter Tumorzellen nach ihrer Transplantation in STU-Mäuse (34) zu Tumoren auswuchsen. Hierzu wurde eine Tumorzellinie ausgewählt, die durch Transformation embryonaler STU-Zellen mit Rous Sarcoma Virus (Schmidt-Ruppin-Stamm) in vitro erhalten worden war und die die Bezeichnung STU-D17 erhielt (35). Dies bedeutet, daß Tumorzellen und Versuchstiere syngen sind, so daß keine Überlagerung durch andere Abwehrmechanismen auftreten konnte, die beobachteten Effekte also ausschließlich auf die gegen das spezifische Tumorantigen gerichtete Immunreaktion zurückzuführen sind. Biologische Aktivität aus dem Kalbsthymusextrakt war an einer Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit des entstehenden Tumors zu erkennen, wobei sowohl Verlangsamung als auch Beschleunigung erwartet werden konnten. Die biologischen Kontrollen erstreckten sich auch auf eine Unterdrückung der Tumorbildung sowie auf eine Regression, die vorübergehend oder auch bleibend sein konnte. Das Testsystem war also in der Lage die folgenden Arten von Aktivität zu unterscheiden:

1.) keine Beeinflussung des Tumorwachstums
2.) Beschleunigung des Tumorwachstums
3.) Verlangsamung des Tumorwachstums
4.) vorübergehende Regression eines Tumors
5.) bleibende Regression eines Tumors
6.) Verhinderung der Tumorbildung

Aufgrund dieser Unterscheidungsmöglichkeiten war das Testsystem in der Lage, biologische Aktivität nicht nur nachzuweisen, sondern auch zu charakterisieren. Bei

der Komplexität des Kalbsthymusextrakts ist es zunächst ohne weiteres möglich, daß verschiedene Komponenten für die eine oder andere biologische Aktivität verantwortlich sein können.

Für die detaillierte Festlegung der Meßgrößen war es wichtig, den zeitlichen Verlauf des Wachstums von Tumoren genau zu kennen. Tumore wachsen nicht gleichförmig bis zu der Größe, mit der sie zum Tod des befallenen Individuums führen. Vielmehr vollzieht sich ihr Wachstum in drei unterscheidbaren Phasen. Ausgehend von einer Mutterzelle (oder im Falle einer Transplantation von mehreren Zellen) wächst ein Tumor in der Maus zunächst zu einer Größe von maximal 1-2 mm Durchmesser heran. In dieser Zeit benötigt er keine Versorgung durch Blutgefäße, da die Diffusion noch ausreicht, die Versorgung und Entschlackung zu sichern. Diese erste Wachstumsphase wird als avasculär bezeichnet (36). Danach stagniert das weitere Wachstum, weil etwa gleich viel Zellen mangels ausreichender Ernährung und Entschlackung zugrunde gehen wie neu entstehen. Gelingt es nun dem Tumor, Blutgefäße aus seiner Umgebung zum Einwachsen zu veranlassen, so kann die abschließende dritte Phase des Wachstums einsetzen. In dieser vasculären Phase verläuft das Tumorwachstum geradezu explosiv und führt in relativ kurzer Zeit zum Tod, wobei für die letzte Zeitspanne nur noch entscheidend ist, wann lebenswichtige Organe so schwer geschädigt werden, daß sie ausfallen.

Bei allen Versuchen mit den STU-D17-Zellen und den STU-Mäusen waren die drei Wachstumsphasen deutlich zu beobachten. Nach Erreichen der Nachweisgrenze wuchsen die Tumore zunächst nicht weiter, sondern behielten die erreichte Größe bei. Erst nach einigen Tagen setzte dann das explosive Wachstum ein.

Für den Test wurden nun die folgenden Meßparameter eingeführt:

1.) Die Zeit, die der Tumor benötigte, um die gerade nachweisbare Größe zu erreichen
2.) Die Zeit, die er benötigte, um einen Durchmesser von 1 cm zu erreichen

Die erste Meßgröße ist somit ein Maß für das Verhalten des Tumors in der avasculären Phase, die zweite gibt den Zeitpunkt an, zu dem die vasculäre Phase in vollem Gang ist. Durch die Wahl der letzteren Meßgröße wurde der Test weniger zeitraubend. Auf die Bestimmung der mittleren Überlebenszeit wurde zunächst verzichtet, solange noch komplexe Substanzgemische ausgetestet werden mußten.

b) Malignität der STU-D17-Zellen

Um Kenntnisse über die Malignität der STU-D17-Zellen zu gewinnen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem in unbehandelte Tiere eine steigende Dosis von Tumorzellen transplantiert wurde.

Es wurden, wie in allen folgenden Versuchen, je 10 Mäuse pro Versuchsgruppe eingesetzt, deren Fell an der Stelle der vorgesehenen Transplantation rasiert war. Die Tiere erhielten Nummern in der Reihenfolge, in der ihre Tumore entdeckt werden konnten. Der Tag der Transplantation wurde als Tag 0 bezeichnet.

Zur Entdeckung der Tumore wurden die Tiere täglich zur gleichen Zeit nach solchen abgesucht. Von großem Vorteil war dabei die Tatsache, daß die Haut der Albinomäuse durchscheinend ist. So erschienen die Tumore zuerst als kleine weiße Punkte. Sie konnten zuverlässig ab einer Größe von 1/2 bis 1 mm Durchmesser gefunden werden.

Zur Dokumentation wurden zwei verschiedene Darstellungsformen gewählt. Einmal waren dies Balkendiagramme wie in Bild 1 abgebildet. Jede Maus erhält quasi eine Lebenslinie, die von einem dicken Balken überlagert ist, wenn das Tier einen feststellbaren Tumor trägt. Endet

nur der Balken, so wurde der Tumor aufgelöst, endet auch die dünne Linie, so hatte der Tumor die Größe von 1 cm Durchmesser erreicht und das Tier wurde getötet. Diese erste Dokumentationsform hat den Vorteil, daß die Ergebnisse sehr anschaulich dargestellt werden können. Jedes Versuchstier ist individuell aufgeführt und Regressionen werden unmittelbar sichtbar.
Die zweite Dokumentationsform waren Tabellen wie die Tabelle 1. Hierbei lassen sich die Ergebnisse einer größeren Zahl von Versuchsgruppen auf engem Raum darstellen. Die Anschaulichkeit geht jedoch zum Teil verloren. Regressionen sind unter Umständen nicht zu erkennen.
Die Ergebnisse des ersten Versuchs sind in Bild 1 und Tabelle 1 dargestellt.

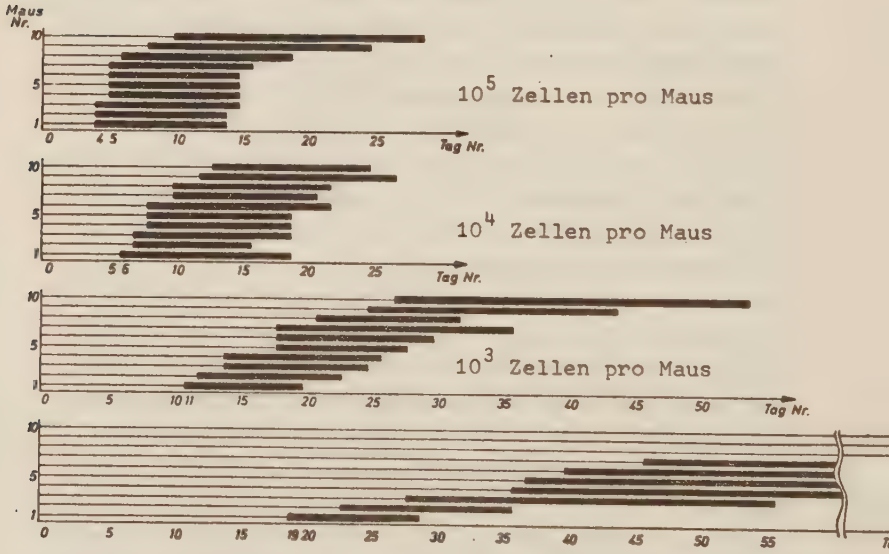


Bild 1: Versuch zur Malignität der STU-D17-Zellen. Die Tiere der zuunterst dargestellten Versuchsgruppe erhielten je 10^2 Tumorzellen. Tag der Transplantation ist der Tag 0. Dicker Balken bedeutet feststellbaren Tumor.

Tabelle 1:

Tag Nr.		5	10	15	20	25	30	40	50	60	70	85
Zellen / Tier	10^5	7/3/0	10/0/0	4/0/6	2/0/8	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
	10^4	0/10/0	8/2/0	10/0/0	5/0/5	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
	10^3	0/10/0	0/10/0	4/6/0	6/3/1	6/1/3	4/0/6	2/0/8	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10
	10^2	0/10/0	0/10/0	0/10/0	1/9/0	2/8/0	2/7/1	4/4/2	5/3/2	4/3/3	3/3/4	0/3/7

Versuch zur Malignität der STU-D17-Zellen. Transplantiert wurden steigende Mengen von Tumorzellen. Die Zahlengruppen haben folgende Bedeutung: erste Zahl gleich Anzahl der Tiere, die Tumore tragen, zweite Zahl gleich Anzahl der Tiere, die noch ohne feststellbaren Tumor sind, dritte Zahl gleich Anzahl der getöteten Tiere.

Es zeigt sich aus Bild 1 und Tabelle 1, daß ab einer Zahl von 10^3 Tumorzellen pro Tier alle Mäuse sichtbare Tumore entwickelten und daran auch starben. Auch bei 10^2 Zellen entwickelten immerhin noch 7 Tiere einen Tumor. Eine Regression wurde, wie auch bei allen anderen unbehandelten, in späteren Versuchen als Kontrolle eingesetzten Tieren nicht beobachtet. Tumorregression ist in diesem Testsystem kein normaler Vorgang.
Der Versuch zeigt auch, daß die Zeit, in der die Tumore bis zur Nachweisgrenze heranwuchsen um so länger war, je weniger Zellen injiziert worden waren, und daß die Zeiten innerhalb einer Versuchsgruppe immer stärker differierten.
Dieser Vorversuch war entscheidend dafür, daß in allen weiteren Versuchen 5×10^4 Tumorzellen pro Versuchsmaus transplantiert wurden. Die Erzeugung von Tumoren auf allen Kontrolltieren war damit genügend gesichert und die Tumore wuchsen gerade so schnell, daß ein genügender Spielraum für die Feststellung von Beschleunigung und Verlangsamung von Tumorwachstum blieb.
Ein weiterer Versuch, der bezüglich der Malignität der STU-D17-Zellen durchgeführt wurde, war ein Vergleich der Malignität von Tumorzellen, die unterschiedlich lange

in den Kulturgefäßen gewachsen waren, die also aus verschiedenen Wachstumsstadien stammten. Aus einer Schale wurden Zellen, die hier bereits in die stationäre Phase übergegangen waren, abtrypsiniert und zu gleichen Teilen auf fünf kleine Plastikschalen verteilt. Nach 24 Stunden wurde die erste Schale zur Bestimmung der Zelldichte mikrophotographiert. Danach wurde abtrypsiniert und eine Bestimmung der Totzellzahl vorgenommen. Schließlich wurden je $5x10^4$ dieser Tumorzellen (der Wert gibt nur die lebenden Zellen wieder, er war also korrigiert) den Tieren einer ersten Versuchsgruppe transplantiert. Nach 48, 55, 72 und 79 Stunden wurde mit je einer weiteren Schale bzw. Versuchsgruppe gleich verfahren.
Das Ergebnis des Versuchs ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigt, daß die Zellen in ihrer Malignität praktisch unabhängig von ihrem Wachstumsstadium in den Kulturgefäßen sind.

Tabelle 2:

Tag Nr.		5	10	15	20	25	30	40	45	Zellzahl
Kulturdauer in Stunden	24	1/9/0	6/4/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	6/0/4	1/0/9	0/0/10	274
	48	2/8/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	8/0/2	4/0/6	0/0/10	0/0/10	634
	55	1/9/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	3/0/7	0/0/10	0/0/10	697
	72	2/8/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	3/0/7	0/0/10	0/0/10	723
	79	2/8/0	8/2/0	9/1/0	10/0/0	8/0/2	3/0/7	1/0/9	0/0/10	709

Vergleich der Malignität von STU-D17-Zellen nach verschieden langer Wachstumszeit in den Kulturgefäßen. Die Zellzahlen wurden durch Auszählen von Mikrophotographien bestimmt. Ausgezählt wurden alle auf der Photographie sichtbaren Zellen. Zum Zahlencode siehe die Tabelle 1.

c) Meßgenauigkeit der biologischen Kriterien

Wie schon erwähnt, wurden die Versuchstiere in Tagesabständen nach neu feststellbaren Tumoren abgesucht. Der Meßfehler muß dabei mit ± 1 Tag angenommen werden. Die-

se Meßgenauigkeit kann dem Testsystem aus den folgenden Überlegungen zugetraut werden:

1.) Wachstumskurven von STU-D17-Zellen in Kulturgefäßen ergaben Generationszeiten von 16 bis 18 Stunden. Wenn diese Wachstumsgeschwindigkeit mit der in etwa übereinstimmt, die in den Versuchstieren erreicht werden kann, so wird sich das Volumen eines Tumors im Laufe eines Tages verdoppeln bis verdreifachen. Dies bedeutet aber, daß die Nachweisgrenze im selben Zeitraum deutlich überschritten wird.

2.) Setzt man das Volumen, mit dem ein Tumor gerade nachweisbar wird mit 0,5 mm^3 fest, entsprechend $5x10^{-4}$ ml, so wird es von einem mit $5x10^4$ Zellen transplantierten Tumor in etwa 5 bis 10 Tagen erreicht. Das Volumen der ursprünglichen $5x10^4$ Zellen entspricht ca. 10^{-6} ml und das bedeutet, daß die Verdopplungszeit zwischen 13 und 24 Stunden beträgt, was auch der in vitro gefundenen Generationszeit recht gut entspricht.

Aus diesen Gründen kann gesagt werden, daß eine Messung der Wachstumsgeschwindigkeit in Eintagesabständen gerechtfertigt ist.

Außer von der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore hängt die erzielbare Meßgenauigkeit noch von weiteren, jedoch nicht so exakt faßbaren Faktoren ab. Diese sind:

a) die Stelle, an der der Tumor wächst
b) ob der Tumor mehr nach außen hin in die Haut des Tieres wächst oder mehr in das darunterliegende Gewebe
c) die Dicke der Mäusehaut, die etwas variierte
d) die Zuverlässigkeit des Ablesers

Alle diese Faktoren konnten jedoch als bedeutungslos eingestuft werden, da es gelang, die Transplantation sehr weitgehend zu standardisieren. Außerdem wurden

alle Werte von einer einzigen Person abgelesen und sehr kritisch betrachtet. Schließlich wurde noch festgesetzt, daß ein Tumor nur dann als vorhanden betrachtet wurde, wenn er an drei aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet worden war, was eine Sicherung gegen Scheinregressionen war.

d) Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war ausgezeichnet, was qualitative Aussagen anbelangt. Auch bei Wiederholung von Versuchen wurden stets die selben Effekte gefunden. Was Zahlenwerte anbelangt war die Aussagekraft des Testsystems jedoch gering. Eine Angabe von Aktivität in Zahlenwerten ist daher nicht möglich.

e) Abschließendes

Zum Abschluß sei noch darauf hingewiesen, daß das Testsystem trotzdem sehr zeitraubend und arbeitsintensiv ist. Im Gegensatz zu in vitro Systemen, die meist in wenigen Stunden zum Ergebnis führen, dauert es hier mindestens 2 bis 3 Wochen, ehe erste Ergebnisse vorliegen und bis zum Abschluß eines Versuches vergehen bis zu zwei Monate, denn erst dann kann von einem Versuchstier mit hinreichender Sicherheit gesagt werden, es sei tumorfrei.

Der entscheidende Vorteil des Systems liegt jedoch darin, daß bei einem in vivo System nur Effekte auftreten, die im lebenden Organismus ablaufen. Es ist daher unmöglich, Artefakte zu beobachten, wie sie häufig von in vitro Systemen erzeugt werden. Die Ergebnisse lassen sich, ohne Umweg über eine Interpretation von in vitro gefundenen Tatsachen, unmittelbar auf den lebenden Organismus anwenden.

II Präparation der aktiven Fraktionen aus Thymus

a) Definition der spezifischen Aktivität

Um die spezifische Aktivität von Fraktionen angeben zu können, wäre es notwendig gewesen, zwei Größen zahlenmäßig einigermaßen exakt angeben zu können. Diese Größen sind:

1.) die Masse des zum Test eingesetzten Materials
2.) das Maß der von einer Fraktion im Test ausgeübten Aktivität

Bei beiden Größen ergaben sich bezüglich der Genauigkeit erhebliche Schwierigkeiten. Alle Fraktionen enthielten noch Salz in wechselnden Mengen, das sich, wie später noch gezeigt wird, nur schwer abtrennen und garnicht quantitativ bestimmen ließ. Die eingewogene Menge war daher zur Massenbestimmung nicht geeignet. Bei den biologischen Tests wurde zunächst dennoch auf diese Größe zurückgegriffen, um den Fortgang der Reinigung des biologisch aktiven Materials zu beschleunigen. Erst später stellte sich dann heraus, daß die Menge der in einer Fraktion enthaltenen Aminosäuren ein geeigneter Parameter zur Bestimmung der eingesetzten Materialmengen war. Daraufhin wurde von allen je getesteten Fraktionen kleine Portionen einer Totalhydrolyse unterworfen und die im Hydrolysat gefundenen Aminosäuren quantitativ bestimmt. Ihre Masse wurde dann als Bezugsgröße bei der Angabe von spezifischen Aktivitäten verwendet.

Noch größere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Angabe der Aktivitätsmenge. Wie schon bei der Besprechung des Testsystems erwähnt, lieferte der Test keine Zahlenwerte für die Aktivität. Es konnte lediglich innerhalb einer Testreihe zwischen stark aktiven und schwach aktiven Fraktionen oder Dosen unterschieden werden. Deshalb wurden Versuchsreihen, bei denen aktive Fraktionen in verschiedenen Dosen eingesetzt wurden, so ausgewertet,

daß die im jeweiligen Test optimal wirksame Dosis als Standard diente. Die spezifische Aktivität wurde dann auf diese Standardaktivität bezogen.
Die Definition der spezifischen Aktivität lautet damit: Optimale Wirksamkeit bezogen auf Masse der Aminosäuren.

b) Thymusaufbereitung

In der vorausgegangenen Diplomarbeit wurde bei der teilweisen Reinigung der dialysablen Thymusfaktoren nach der von G.Ströbel entwickelten Methode vorgegangen (26). Es hatte sich jedoch gezeigt, daß die Methode zumindest bei größeren Ansätzen nicht die gewünschten Ergebnisse hinsichtlich der Trennung der Fraktionen lieferte. Es wurde daher beschlossen den Trennungsgang neu zu überarbeiten und weiterzuentwickeln.
Ausgangsmaterial für die Präparation war frischer Kalbsthymus, der unmittelbar nach der Entnahme aus dem Tier eingefroren wurde. In dieser Form wurde er vom Schlachthaus bezogen. Er wurde aufgetaut, vom Bindegewebe befreit und in kleine Stücke geschnitten. Die nachfolgende Homogenisation wurde im Kühlraum durchgeführt. Sie erfolgte mit Hilfe eines Sorvall Omni-Mixers unter Eiskühlung. Als Puffer diente 0,1 M NH_4HCO_3, 1 l Puffer zu 1 kg Thymus. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß der von G.Ströbel in allen Präparationsschritten verwendete Puffer PBS zu einer beträchtlichen Salzkonzentration in den isolierten Fraktionen führte. Anorganische Salze können jedoch mit der von G.Ströbel angewendeten Methode nicht wieder abgetrennt werden. Sie werden im Gegenteil eher angereichert. Diese Änderung des Puffersystems brachte eine wesentliche Reduzierung des Salzgehaltes. Das unter diesen Bedingungen erhaltene Homogenat war eine orangegelb bis gelb gefärbte, breiartige Brühe.
Dieses Homogenat wurde nun 1 Stunde bei 3000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Temperatur betrug 4°C.

Das Sediment wurde mit wenig Bicarbonatpuffer resuspendiert und erneut 1 Stunde mit 3000 g zentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment verworfen und der noch stark trübe Überstand zur Volumenverkleinerung lyophilisiert. Man erhielt ein rötliches Pulver. Dieses wurde in möglichst wenig Wasser aufgenommen, wobei das unlösliche Material aggregierte, so daß es durch eine erneute einstündige Zentrifugation weitgehend abgetrennt werden konnte. Auch diese Zentrifugation wurde mit 3000 g 1 Stunde lang durchgeführt. Der nun erhaltene Überstand des Homogenats war eine bräunliche, stark opalisierende Flüssigkeit.

c) Dialyse

Zur Gewinnung der dialysablen Thymusfaktoren, also der aktiven Komponenten aus dem Thymus, die bei einer Dialyse in das Außendialysat gelangen, waren zwei Methoden möglich, nämlich einerseits die Dialyse mit den üblichen Dialyseschläuchen und andererseits die Ultrafiltration mit Dialyse-Membranen. Beide Methoden wurden zunächst ausprobiert, ehe eine Entscheidung für eine davon getroffen wurde.

Der 3000 g Überstand des Homogenats wurde bei der ersten Aufarbeitung in zwei gleiche Teile aufgeteilt und getrennt weiterverarbeitet. Die eine Hälfte wurde in Dialyseschläuche gefüllt und dreimal gegen Wasser mit Natriumazid als Bakterizid dialysiert. Der Azidgehalt betrug 0,004%. Der Verlauf der Dialyse wurde durch Messen der optischen Dichte des Außendialysats bei 260 nm verfolgt. Eine Aufzeichnung der Werte einer solchen Meßreihe ist in Bild 2 wiedergegeben. Das Außendialysat wurde gesammelt und lyophilisiert. Es bestand aus leicht gelblichem, krustigem bis schmierigem Material, das an der Luft Wasser anzog.

Die zweite Hälfte des 3000 g Überstands des Homogenats wurde zunächst 2 Stunden bei 46000 g zentrifugiert. Der

nun klare Überstand wurde mit 0,004% Natriumazid versetzt und einer Druckfiltration über Amicon UM2 Filter unterzogen. Der Durchlauf wurde gesammelt und lyophilisiert. Seine Konsistenz war wie diejenige des Außendialysats.

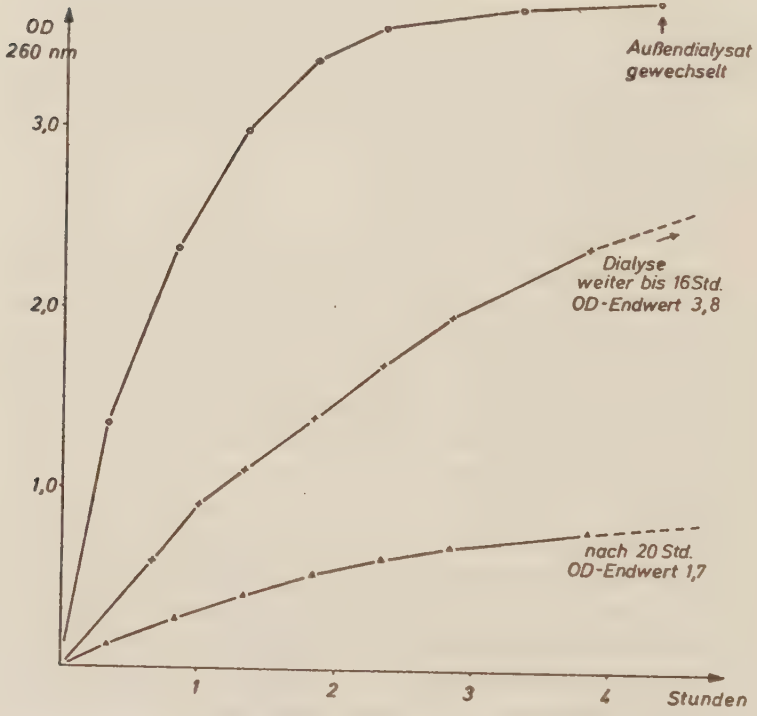


Bild 2: Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte des Außendialysats bei 260 nm. Es wurde zunächst 4 Std. und 20 min. dialysiert. Die Zunahme der optischen Dichte dieses ersten Außendialysats ist in der mit —•——•— gezeichneten Kurve wiedergegeben. Es wurde abgegossen und neues Wasser zugegeben. —•——•— zeigt die optische Dichte des zweiten und —•—•— die des dritten Außendialysats.

Mit dem Außendialysat und dem Durchlauf der Ultrafiltration wurde nun ein Aktivitätstest durchgeführt. Die Applikationsbedingungen sind in Teil E genauer angegeben. Der Zeitraum für die Behandlung mit den Dialysaten war so gewählt worden, daß vom Tag -5 bis zum Tag +4 die jeweilige Fraktion gegeben wurde. In der vorausgegangenen Diplomarbeit hatte sich eine solche Behandlungsdauer als optimal erwiesen. Das Resultat des Tests ist in Bild 3 und Tabelle 3 dargestellt.

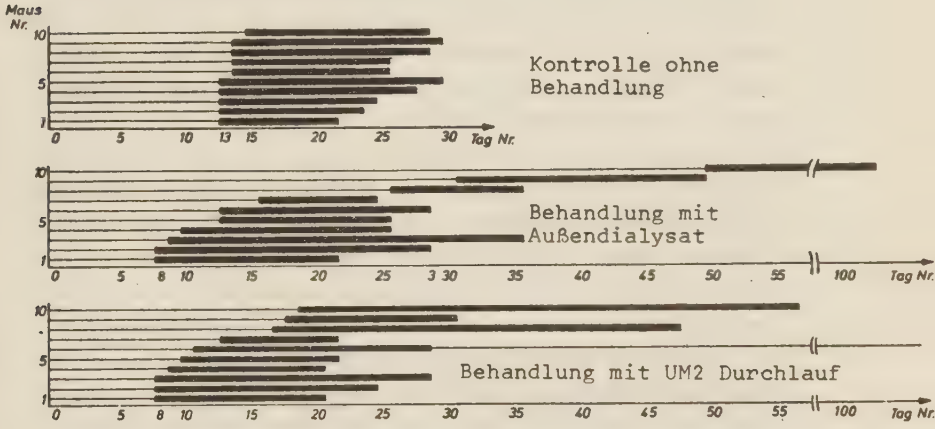


Bild 3: Aktivitätstest mit den Fraktionen der verschiedenen Dialysen. Dicker Balken bedeutet feststellbaren Tumor beim betreffenden Tier.

Tabelle 3:

Tag Nr.	8	12	15	20	25	30	35	40	50	70	100
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
Außendialysat	2/8/0	4/6/0	6/4/0	7/3/0	5/3/2	2/2/6	3/1/6	1/1/8	1/0/9	1/0/9	0/0/10
Ultrafiltrat	3/7/0	6/4/0	7/3/0	10/0/0	5/0/5	3/1/6	2/1/7	2/1/7	1/1/8	0/1/9	0/1/9

Tabelle zum Aktivitätstest mit den Fraktionen der Dialysen. Die Bedeutung des Zahlencodes ist wie bei den Tabellen 1 und 2: Mäuse mit Tumor / Mäuse ohne Tumor / getötete Mäuse.

Der Test zeigt, daß sowohl die ultrafiltrierte Fraktion, als auch das Außendialysat aktiv waren. Beide Produkte beschleunigten bei einem Teil der Versuchstiere das Wachstum der Tumore. Während jedoch das Außendialysat bei 3 von 10 Tieren für eine zum Teil erhebliche Verlangsamung des Tumorwachstums führte, trat bei der ultrafiltrierten Fraktion eine Regression nach 18 Tagen "Tumortragezeit" auf, so daß ein Tier überlebte.

Außer dem biologischen Vergleich wurde mit Hilfe eines Dünnschichtchromatogramms auch ein biochemischer Vergleich zwischen dem Außendialysat und der ultrafiltrierten Fraktion durchgeführt. Laufmittel war das in Teil E mit Nr. 1 bezeichnete Lösungsmittelgemisch; als Träger wurde Kieselgel verwendet. Bei diesem Vergleich erwiesen sich die beiden Produkte als gleichartig, wenn auch eingeräumt werden muß, daß in beiden eine so große Anzahl von Einzelkomponenten vorhanden war, daß geringere Unterschiede dadurch hätten überdeckt sein können.

Die Unterschiede in der Art ihrer Aktivität waren Anlaß dafür, daß die beiden Produkte weiter untersucht wurden. Hierzu wurde eine Portion Außendialysat über UM2 Filter geschickt. Es wurde zunächst filtriert bis das Retentat fast trocken war. Dann wurde mit Wasser wieder auf das alte Volumen gebracht und erneut bis fast zur Trockne filtriert. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Retentat und Durchlauf wurden lyophilisiert. Dabei zeigte es sich, daß die weit überwiegende Menge durchgelaufen war.

Eine weitere Portion Außendialysat wurde in Wasser gelöst und im Wasserbad 30 Minuten lang auf 70°C erhitzt. Danach wurde die so behandelte Portion Außendialysat wieder lyophilisiert.

In einem weiteren Test wurden die erhaltenen Präparate auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse. Das Außendialysat, das

Tabelle 4

Tag Nr.	6	10	15	18	21	25	35	45	60	80	100
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	0/10/0	1/9/0	9/1/0	10/0/0	3/0/7	2/0/8	0/0/10	0/0/10	0/0/10
Außen-dialysat	0/10/0	1/9/0	3/7/0	4/6/0	7/3/0	8/2/0	7/0/3	3/0/7	0/0/10	0/0/10	0/0/10
Außendial. erhitzt	0/10/0	2/8/0	5/5/0	5/5/0	8/2/0	10/0/0	6/1/3	3/3/4	1/2/7	1/2/7	0/2/8
Ultrafiltr. Filtrat	1/9/0	5/5/0	6/4/0	6/4/0	9/1/0	9/1/0	4/1/5	2/1/7	1/0/9	1/0/9	0/0/10
Ultrafiltr. Retentat	0/10/0	0/10/0	1/9/0	3/7/0	9/1/0	9/0/1	4/0/6	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10

Aktivitätstest mit den verschieden aufgearbeiteten Außendialysaten. In der ersten Spalte sind die Fraktionen angegeben, mit denen die Tiere vorbehandelt worden waren. Der Zahlencode bedeutet: Tumortragende Tiere / tumorfreie Tiere / getötete Tiere

UM2 Filtrat, sowie auch das auf 70°C erhitzte Außendialysat zeigten biologische Aktivität. Keine Aktivität wurde beim UM2 Retentat gefunden. Hinsichtlich der Art ihrer Aktivität unterschieden sich die drei Fraktionen. Das Außendialysat zeigte bei wenigen Tieren ein beschleunigtes und ebenso bei wenigen Tieren ein verzögertes Tumorwachstum. Beim auf 70°C erhitzten Außendialysat trat der Beschleunigungseffekt stärker auf aber es fehlten die verlangsamt wachsenden Tumore. Dafür konnten allerdings zwei Tiere ihre Tumore ganz und eines seinen vorübergehend zum Verschwinden bringen. Das UM2 Filtrat schließlich hatte bei 6 Tieren eine beträchtliche Beschleunigung des Tumorwachstums erzeugt, aber nur bei einem einzigen Tier eine merkliche Verlangsamung.

Dieses Ergebnis war schwierig zu deuten. Eine mögliche Erklärung war, daß das Testsystem auf zwei (oder mehrere) im Außendialysat vorhandene Komponenten reagiert hatte. Diese wären demnach für verschiedene, einander entgegengerichtete Effekte verantwortlich gewesen, was gleichzeitig bedeutet hätte, daß bei der Ultrafiltration eine, für die Verzögerung verantwortliche Komponente abgetrennt worden wäre. Erstaunlich war dann aber, daß das Retentat der Ultrafiltration überhaupt keine Akti-

vität gezeigt hatte. Die selbe Komponente wäre dann auch hitzeempfindlich, erkennbar daran, daß das erhitzte Außendialysat keine verzögernde Aktivität gezeigt hatte.

Die biologische Alternative zu dem Mehrkomponentensystem war eine starke Dosisabhängigkeit der Aktivität. Es hätte dann aber vorausgesetzt werden müssen, daß verschiedene Dosen der aktiven Komponente(n) zu unterschiedlichen Arten von Aktivität führen. Um das zu klären wurde mit dem Außendialysat noch ein zusätzlicher Versuch durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden verschiedene Testgruppen von Mäusen mit steigenden Dosen der Fraktion behandelt. Die applizierten Mengen lagen zwischen 0,1 mg und 5 mg pro Versuchstier. Bild 4 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

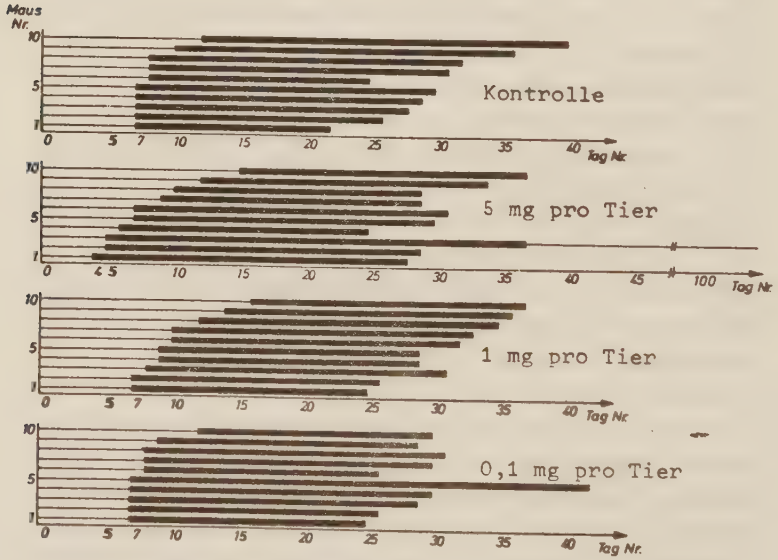


Bild 4: Dosisabhängigkeit der biologischen Aktivität des Außendialysats. Die Applikation erfolgte vom Tag -5 bis zum Tag +4. Tumortransplantation war am Tag 0.

Obwohl die beobachteten Effekte bei diesem Versuch nicht so deutlich ausgeprägt waren wie in den vorangegangenen Versuchen, war doch zu sehen, daß die verschiedenen Arten von biologischer Aktivität bei verschiedenen Dosen unterschiedlich stark auftraten. Die niedrigste eingesetzte Dosis lag offenbar unter der Nachweisgrenze des Testsystems. Nach höheren Dosen hin tritt zunächst eine Verlangsamung des Tumorwachstums auf und erst bei noch höheren Gaben an Außendialysat erscheinen auch beschleunigt wachsende Tumore. Dennoch kann nicht einfach von einem Umkippen der biologischen Aktivität von Verlangsamung nach Beschleunigung gesprochen werden. Dies ist auch daran zu sehen, daß die einzige, bei diesem Versuch beobachtete Regression bei der höchsten Dosis stattfand. Als die am optimalsten wirksame Dosis wurde die höchste betrachtet, da hier die beobachteten Effekte am deutlichsten ausgeprägt waren. Nach Hydrolyse und Aminosäurenanalyse ergab sich, daß die Tiere in den 5 mg Außendialysat 0,6 mg Aminosäuren erhalten hatten. Die spezifische Aktivität war somit: Optimale Wirksamkeit pro 0,6 mg Aminosäuren.
Die Konsequenz des Versuchs bestand vor allem darin, daß bei der weiteren Reinigung der dialysablen Thymusfaktoren stets Dosisabhängigkeiten bestimmt werden mußten.
Nach Abschluß der Versuchsreihe mit den verschiedenen Dialyseprodukten wurde schließlich entschieden, daß zur Fortsetzung der Reinigung vom Außendialysat ausgegangen wurde. Diese Entscheidung war rein praktischer Art, denn der Weg zum Außendialysat ist technisch einfacher als der zum Durchlauf der Ultrafiltration.

d) Gelpermeation mit Biogel P2

Als erste Methode zur Auftrennung des Außendialysats bot sich eine Chromatographie mit einem Molekularsiebmaterial an. Schon G.Ströbel hatte mit der Auftrennung

seines Außendialysats über Biogel P10 eine solche Methode gewählt (26), wobei die Wahl bei ihm wohl deshalb auf Biogel P10 gefallen war, weil Dialyseschläuche Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10000 Dalton ins Außendialysat passieren lassen. Der Trennbereich von Biogel P10 reicht von 10000 bis ca. 1000 Dalton und stimmt damit gut mit dem Molekulargewichtsbereich überein, den die Komponenten des Außendialysats überspannen. Es hatte sich jedoch gezeigt, daß die biologisch aktiven Komponenten von Biogel P10 nahe 100% Säulenvolumen eluiert werden, wo P10 nicht mehr optimal zu trennen vermag. In der vorausgegangenen Diplomarbeit wurde gezeigt, daß die mit P10 erhaltenen Fraktionen sich tatsächlich nur wenig unterschieden. Weitere Versuche hatten ergeben, daß auch die Aktivität auf einen größeren Bereich des Eluats verteilt war. Es wurden daher Vorversuche mit feinporigeren Molekularsiebmaterialien (Biogel P6, P4 und P2) durchgeführt, in deren Verlauf sich zeigte, daß nur Biogel P2 in der Lage war, biochemisch klar voneinander verschiedene Fraktionen in dem Bereich zu erzeugen, in dem aktives Material nach den Versuchen mit P10 erwartet werden konnte. Somit wurde dieses Molekularsieb für die weitere Trennung verwendet.

Wie schon erwähnt, war ein Problem der Aufarbeitung der Gehalt der Fraktionen an anorganischen Salzen und anderen niedermolekularen Substanzen wie Zucker oder freie Aminosäuren. Um den Salzgehalt von vorneherein so niedrig wie möglich zu halten, wurde auch der Elutionspuffer gegenüber früheren Aufarbeitungen geändert. Statt phosphatgepufferter Saline (PBS) wurde 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung als Elutionspuffer angewendet. Die Trennung verlief, was die Form der erhaltenen Elutionsdiagramme anbelangt, völlig identisch mit der phosphatgepufferten Saline.

Für die Chromatographie wurde das folgende Standardsystem verwendet:

Säulenlänge:	240 cm
Säulendurchmesser:	4,7 cm
Säulenvolumen:	4300 ml
Druckdifferenz:	280 cm Wassersäule
Fraktionen:	20 ml
Durchflußrate:	ca. 400 ml/h
Puffer:	0,1 M NH_4HCO_3 mit 0,004% NaN_3

Das Außendialysat wurde in Portionen von je 2 g in 10 ml Wasser gelöst und vom unlöslichen Material abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Dazu war eine Teflonfritte auf das Biogel aufgesetzt worden. Bild 5 zeigt ein Elutionsdiagramm, das bei 254 nm aufgenommen und vom automatischen UV-Durchflußphotometer aufgezeichnet wurde.

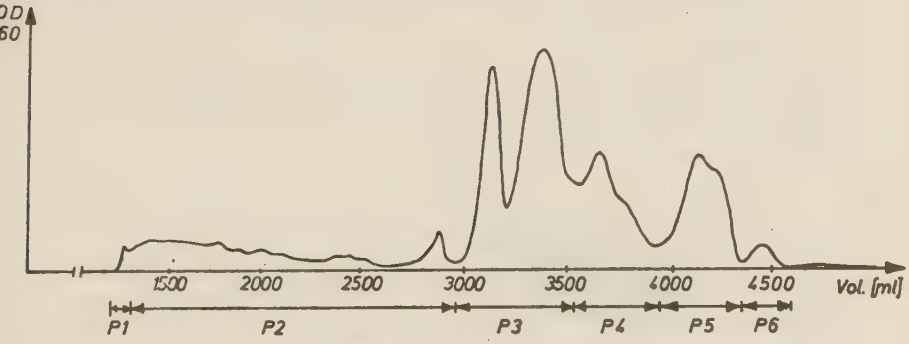


Bild 5: Elutionsdiagramm der Biogel P2 Säule. Aufgetragen wurden 2 g Außendialysat.

Es wurde, wie im Bild eingezeichnet, in die Fraktionen P1 bis P6 vereinigt und lyophilisiert. Die Lyophilisation wurde für zwei bis drei Tage fortgesetzt, wenn alles Eis abgedampft war, um das Ammoniumbicarbonat möglichst weitgehend abzutrennen.

Nach dem Trocknen der Fraktionen wurde zunächst ein Vortest mit nur einer Konzentration von jeder P2-Fraktion durchgeführt, der zeigen sollte, welche die aktiven Komponenten enthielt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt. Zur Verdeutlichung wurden noch die Balkendiagramme der Kontrollgruppe und der Gruppe, die die Fraktion P3 erhalten hatte in Bild 6 aufgezeichnet.

Tabelle 5:

Tag Nr.	8	10	12	15	20	25	30	35	45	100	134
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	0/10/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
P 1	0/10/0	0/10/0	1/9/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10
P 2	0/10/0	2/8/0	2/8/0	8/2/0	10/0/0	7/0/3	4/0/6	2/0/8	0/0/10	0/0/10	0/0/10
P 3	3/7/0	8/2/0	9/1/0	10/0/0	8/0/2	3/0/7	1/0/9	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10
P 4	2/8/0	6/4/0	7/3/0	10/0/0	8/0/2	5/0/5	2/0/8	2/0/8	0/1/9	1/0/9	0/0/10
P 5	0/10/0	1/9/0	2/8/0	7/3/0	10/0/0	8/0/2	7/0/3	2/0/8	0/0/10	0/0/10	0/0/10
P 6	0/10/0	0/10/0	0/10/0	9/1/0	10/0/0	8/0/2	1/0/9	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/0/10

Aktivitätstest mit den Fraktionen der Biogel P2 Säule. Alle Tiere erhielten je 4 mg der jeweiligen Fraktion in 10 Portionen zu 0,4 mg vom Tag -5 bis zum Tag +4. Zum Zahlencode siehe die Tabellen 1 bis 4.

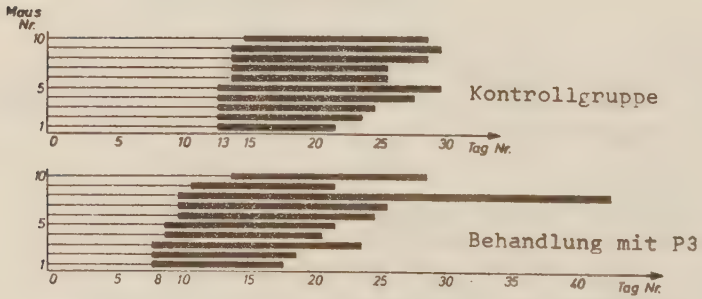


Bild 6: Aktivitätstest mit den Fraktionen der Biogel P2 Säule. Aufgezeichnet sind nur die Kontrollgruppe und die Gruppe, die P3 erhalten hatte. Bei dieser Gruppe war die Aktivität am stärksten zu beobachten.

Wie die Tabelle zeigt, wurde ausschließlich beschleunigende Aktivität gefunden und zwar in den Fraktionen P3 und P4 in nahezu gleicher Stärke. Erstaunlicherweise konnte jedoch in keiner der Fraktionen verzögernde Aktivität festgestellt werden, obwohl diese im Ausgangsmaterial stets nachzuweisen gewesen war. Die beiden Fraktionen P3 und P4 wurden daraufhin vereinigt und unter der Bezeichnung P3/4 in den weiteren Versuchen eingesetzt.
Zur genaueren Charakterisierung der Mischfraktion P3/4 wurde ein biologischer Test durchgeführt, bei dem nun aufgezeigt werden sollte, wie die Aktivität mit der im Test eingesetzten Menge P3/4 zusammenhängt.
Die Versuchstiere erhielten also zwischen 0,5 und 50 mg der Fraktion P3/4. Das Ergebnis des Tests ist in Bild 7 dargestellt. Es zeigte sich, daß die Aktivität von P3/4 klar von der Menge des im Test eingesetzten Materials abhängt, was sich, ähnlich wie auch beim Außendialysat, in unterschiedlicher Art von Aktivität bei verschiedenen Dosen ausdrückt. Am erstaunlichsten war die Erkenntnis, daß es nicht nur eine untere Nachweisgrenze für die biologische Aktivität der Fraktionen gibt, sondern auch eine obere. Unabhängig davon, daß sich trotzdem im Immunsystem der Versuchstiere Veränderungen abspielen können, führen hohe Dosen dazu, daß im Test keine Aktivität mehr festzustellen ist. Die niederen Dosen zeigten den besten Schutz gegen Tumore von STU-D17-Zellen. Allerdings schien die untere Grenze der Wirksamkeit in diesem Versuch noch nicht erreicht worden zu sein.
Das Ergebnis des Tests war von großer Bedeutung für die weitere Entwicklung des Trennungsganges zur Reinigung der Thymusfaktoren oder des Thymusfaktors. Dadurch, daß es eine obere Grenze für die nachweisbare Aktivität gibt, war bereits das Auffinden von aktiven Fraktionen erschwert. Eine stark angereicherte Fraktion

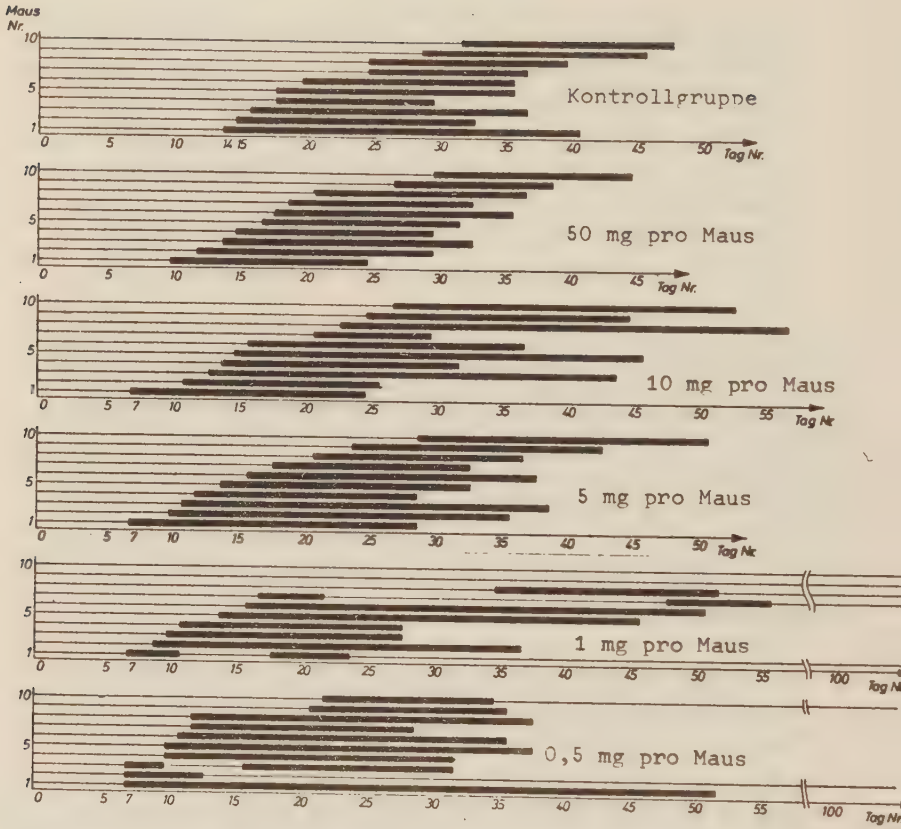


Bild 7: Test zur Bestimmung der Abhängigkeit der Aktivität der Mischfraktion P3/4 von der eingesetzten Dosis. ▬▬ = Tier trägt Tumor.

konnte ihre Aktivität unter Umständen dadurch der Entdeckung entziehen, daß ihre im Test eingesetzte Dosis in einem Bereich lag, in dem das Testsystem nicht mehr in meßbaren Kriterien reagieren konnte. Rückblickend wurde nach diesem Befund klar, daß es offenbar nur ein glücklicher Zufall gewesen war, daß die ersten Versuche mit den Außendialysaten Erfolg gehabt hatten. Die ein-

gesetzten Dosen lagen eben in dem Bereich, in dem die Aktivität gut aufzufinden war.
Die Entscheidung, welche der eingesetzten Dosen als die am optimalsten wirksame bezeichnet werden sollte, fiel bei diesem Versuch recht leicht. gewählt wurde die Dosis von 1 mg pro Versuchstier. Die Bestimmung der in dieser Menge enthaltenen Aminosäuremasse ergab einen Wert von 0.08 mg pro 1 mg Einwaage. Somit war die spezifische Aktivität: Optimale Wirksamkeit pro 0,08 mg Aminosäuren. Es war eine Anreicherung um etwa den Faktor 10 mit der Gelpermeation über Biogel P2 gelungen.

e) Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2
Nachdem Vorversuche mit sauren und basischen Ionenaustauschern durchgeführt worden waren, wurde zur weiteren Reinigung der Thymusfaktoren der stark saure Austauscher Dowex 50 WX 2 gewählt. Die Trennung wurde mit einem pH-Stufengradienten durchgeführt. Die Elutionspuffer waren Ammoniumacetatpuffer. Bei dieser Methode war es von großem Vorteil, daß die einzelnen Fraktionen nur jeweils in einem sehr eng begrenzten Bereich des Eluats enthalten waren. Im Elutionsdiagramm ergaben sie stets enge und scharfe Spitzen. Die Elution erfolgte an den pH-Sprüngen. Somit mußten für jede Fraktion nur wenige Volumeneinheiten des Eluats vereinigt werden, was den Salzgehalt nach dem Lyophilisieren niedrig halten half. Außerdem hatten weitere Vorversuche schon gezeigt, daß die Aktivität in den stark basischen Fraktionen enthalten war. Da diese von Dowex 50 WX 2 zuletzt eluiert werden, konnte angenommen werden, daß gerade mit diesem Ionenaustauscher der größte Reinigungseffekt erzielt werden könnte.
Für die Chromatographie wurde das folgende Standardsystem entwickelt:

Säulenlänge:	53 cm
Säulendurchmesser:	4,6 cm

Säulenvolumen:	880 ml
Fraktionen:	20 ml
Durchflußrate:	ca. 400 ml/h
Startpuffer:	0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 3,7
2. Puffer:	0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 6,0
3. Puffer:	0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 9,5
Endpuffer:	conc. Ammoniak auf 1/10 verdünnt mit Wasser ≙ 1,2 M Ammoniak

Für den Lauf wurde die Säule zunächst mit 1 n HCL gewaschen, um sie in die saure Form zu bringen. Danach wurde mit genau zwei Säulenvolumen Startpuffer gespült. Das Eluat zeigte jetzt einen pH-Wert von 2,7. 5 g P3/4 wurden in wenig Wasser aufgenommen und unter Kühlung mit Eis auf pH 2,0 gebracht. Diese Lösung wurde durch Auflaufenlassen auf die Säule aufgetragen und sofort der 2. Puffer nachgeschickt. Die Front mit pH 6,0 wanderte nun sehr langsam durch die Säule, wobei ihr der Durchlauf weit davonlief. Dadurch wurde bei pH 2,7 eine erste Fraktion erhalten, die als Durchlauf oder Do1 bezeichnet wurde. Ihr folgte in geringem Abstand eine weitere Fraktion, die zwar gebremst über die Säule lief, aber nicht festgehalten wurde. Erst viel später, wenn der pH-Wert des Eluats auf 6,0 sprang, wurde dann die nächste größere Fraktion erhalten.

Nachdem der pH-Sprung auf 6,0 das untere Ende der Säule passiert hatte wurde der 3. Puffer aufgesetzt. Es wurde ein Säulenvolumen durchgeschickt. Danach folgte der Endpuffer. Bild 8 zeigt ein Elutionsdiagramm, auf dem sowohl der Verlauf des pH-Werts als auch der optischen Dichte bei 254 nm aufgezeichnet ist.

Es wurde entsprechend der Markierung in Fraktionen vereinigt. Die Fraktionen wurden mit Do1 bis Do7 bezeichnet. Das Eluat zwischen den pH-Sprüngen wurde sicherheitshalber mitgesammelt, da ja weder das Verhalten der aktiven Komponenten auf der Säule sicher vorausgesagt werden konnte, noch bekannt war, ob diese überhaupt im

UV-Bereich absorbierend war. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Lyophilisieren getrocknet. Da hierbei die in den Puffern enthaltene Essigsäure nur sehr schwer abzudampfen war, mußten alle Fraktionen nach einem ersten Trocknen noch einmal mit Wasser wieder aufgenommen und erneut lyophilisiert werden, um sie als Pulver zu erhalten.

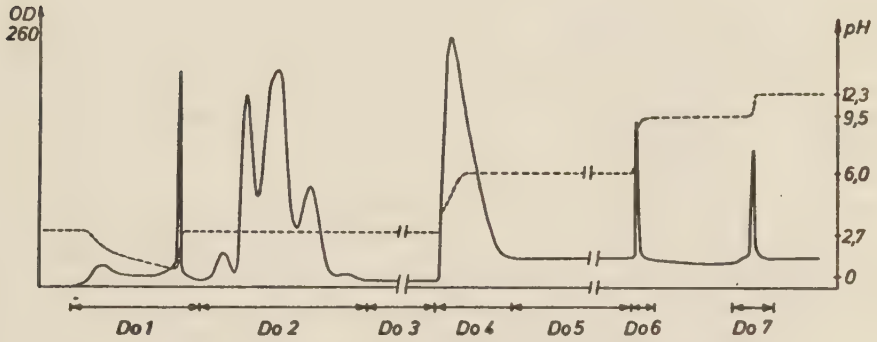


Bild 8: Elutionsdiagramm der Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2. Aufgetragen waren 5 g P3/4. Im Diagramm eingezeichnet sind die optischen Dichte bei 260 nm ———— und der Verlauf des pH-Wertes - - - - - -.

f) Entsalzung über Dowex 50 WX 2

Alle Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie enthielten trotz der Verwendung flüchtiger Puffer noch beträchtliche Mengen an Salzen. Daher mußte vor der Verwendung in biologischen Tests und in biochemischen Untersuchungen eine möglichst gründliche Entsalzung vorgenommen werden. Biogel P2 mit Wasser war hierzu jedoch nicht geeignet, da Versuche gezeigt hatten, daß in diesem Medium Salze und Komponenten gemeinsam eluiert wurden. Aus diesem Grund wurde eine Entsalzung mit einem Ionenaustauscher versucht. Gewählt wurde wieder der stark saure Austauscher Dowex 50 WX 2. Bei ihm konnte

erwartet werden, daß die Anionen der Salze durchlaufen würden und die Komponenten mit den Kationen der Salze festgehalten würden. Wenn es gelang die Komponenten der Fraktionen zu eluieren, ohne daß auch die Kationen den Ionenaustauscher verließen, so sollte mit dieser Methode eine Entsalzung möglich sein. Zur Elution wurde die flüchtige Base Ammoniak verwendet. Sie sollte schwach genug sein um nicht Kationen wie K^+, Na^+ oder Ca^{++} zu verdrängen.

Das Standardsystem zur Entsalzung war das folgende:

Säulenlänge:	40 cm
Säulendurchmesser:	2,7 cm
Säulenvolumen:	245 ml
Startpuffer:	Wasser
Fraktionen:	10 ml
Endpuffer:	1,2 M Ammoniak

Die Säule wurde mit 1 M HCL in die saure Form gebracht und mit Wasser äquilibriert. Danach wurde die zu entsalzende Fraktion in angesäuerter Form aufgetragen und es wurde mit Wasser nachgewaschen bis der Durchlauf aus der Säule war. Schließlich wurde der Ammoniak nachgeschickt und die Fraktionskomponenten eluiert. Ein typisches Elutionsdiagramm ist in Bild 9 wiedergegeben.

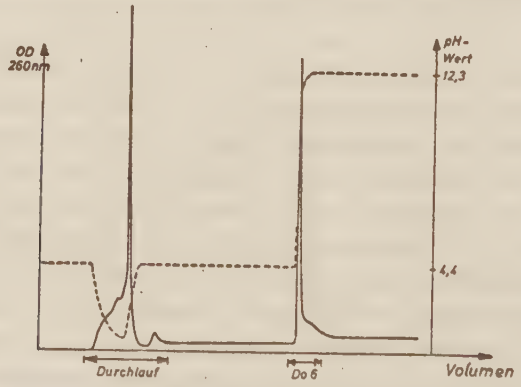


Bild 9: Elutionsdiagramm einer Entsalzung über Dowex. Eingetragen sind pH-Wert---- und OD 260 ———.

Von jeder Fraktion wurden der Durchlauf und das an der Ammoniakfront eluierte Material getrennt gesammelt und lyophilisiert. Mit Ausnahme des Durchlaufs der Fraktion Do1 waren die Durchläufe aller anderen Fraktionen vollständig füchtig. Das mit dem Ammoniak eluierte Material ergab nach dem Lyophilisieren leicht gelb gefärbte Pulver. In dieser Form wurden die Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie für die nachfolgenden Charakterisierungsversuche eingewogen.
Erste biologische Tests mit den Fraktionen der Dowex-Säule ergaben nur unbefriedigende Ergebnisse. Zwar wiesen sie darauf hin, daß Do6 und Do7 die Aktivität entnielten, aber die beobachteten Effekte waren zu schwach ausgeprägt. Offenbar war mit zu hohen Dosen gearbeitet worden, so daß die schon bei der Fraktion P3/4 beobachtete Mengenabhängigkeit die Aktivität nicht hatte offenbar werden lassen. Allerdings konnten die Fraktionen Do3 und Do5 als mögliche aktive Fraktionen ausgeschlossen werden. Sie wurden daraufhin verworfen.
Schließlich wurde ein erneuter Versuch durchgeführt, bei dem in drei Versuchsreihen immer niedrigere Dosen eingesetzt wurden. Getestet wurden die Fraktionen Do1/2 (Do1 und Do2 vereinigt), Do4, Do6 und Do7, sowie als Positivkontrollen die Fraktion P3/4 und das Außendialysat. Die eingesetzten Mengen unterschieden sich von einer Reihe zur nächsten jeweils um den Faktor 10, bei Außendialysat und P3/4 unterschieden sich die beiden höchsten Dosen nur um den Faktor 5.
Diesmal waren die Ergebnisse eindeutig. Sie sind in Tabelle 6 in Form einer Übersicht zusammengestellt. Auf eine Wiedergabe aller Balkendiagramme oder Tabellen wurde aus Platzgründen verzichtet.
Wie schon vermutet waren Do6 und Do7 die aktiven Fraktionen. Diese Aktivität war bei den niedrigsten Dosen am stärksten zu beobachten. Die untere Grenze der Nachweisbarkeit schien noch nicht erreicht worden zu sein.

Tabelle 6:

Fraktion	Art der Aktivität bei Behandlung mit			
	5 mg	1 mg	0,1 mg	0,01 mg
Außendialysat	schwache Verzögerung	Beschleunigung 1 Regression	inaktiv	nicht getestet
P 3/4	Verzögerung 1 Regression	Beschleunigung schwache Verzögerung	starke Verzögerung	nicht getestet
Do 1/2	nicht getestet	inaktiv	inaktiv	inaktiv
Do 4	nicht getestet	inaktiv	inaktiv	inaktiv
Do 6	nicht getestet	Verzögerung 1 vorübergehende Regression	starke Verzögerung	starke Verzögerung
Do 7	nicht getestet	Beschleunigung schwache Verzögerung	starke Verzögerung 1 Regression	starke Verzögerung

Tabelle zum Aktivitätstest zur Auffindung der biologischen Aktivität in den Fraktionen der Dowex-Säule. Aus Platzgründen wurde nur eine Übersichtstabelle aufgeführt. Do6 und Do7 waren die Fraktionen, die die biologische Aktivität enthielten.

Die zur Kontrolle mitgetesteten Fraktionen zeigten ihre Aktivität wie erwartet bei deutlich höheren Dosen. Ihre spezifische Aktivität, soweit sie aus diesem Versuch bestimmt werden konnte, stimmte gut mit der schon früher gefundenen überein. Was Do6 und Do7 betrifft, war die Abhängigkeit der Aktivität von der Menge des eingesetzten Materials bereits jetzt wiedergefunden worden.

Um die untere Nachweisgrenze für die Dowex-Fraktionen und die am optimalsten wirksame Dosis zu finden, wurde mit Do6 und Do7 noch ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die beiden Fraktionen zu gleichen Gewichtsteilen gemischt und so getestet wurden. Die angewendeten

Mengen wurden noch einmal kräftig gegenüber dem vorhergehenden Versuch herabgesetzt. Bild 10 und Tabelle 7 zeigen das Resultat des Versuchs.

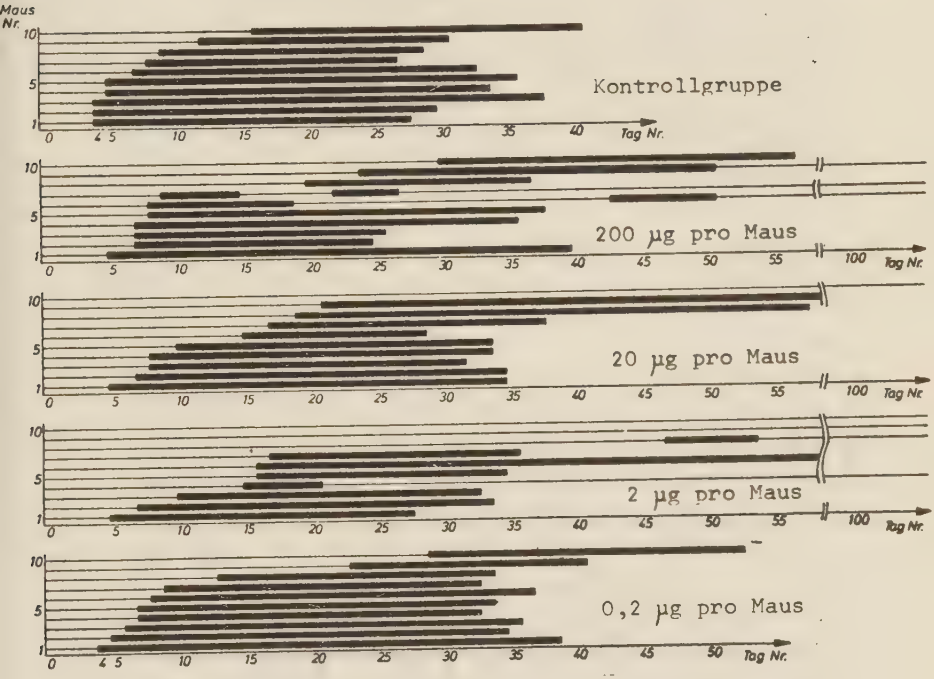


Bild 10: Test zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Fraktion Do6/7

Für die Mischfraktion Do6/7 war die Grenze der Nachweisbarkeit offenbar bei 200 ng pro Versuchstier erreicht. Die am optimalsten wirksame Dosis lag nicht sehr weit über der gerade noch nachweisbaren. Da in diesem Test die Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolltumore schon relativ hoch gewesen war, konnte beschleunigende Aktivität nicht mehr nachgewiesen werden. Die Entscheidung, welche der eingesetzten Dosen

Tabelle 7:

eingesetzte Menge Do 6/7 in µg	Tag Nr. 4	7	10	15	20	25	30	35	45	55	100
-	3/7/0	6/4/0	8/2/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	6/0/4	3/0/7	0/0/10	0/0/10	0/0/10
20	0/10/0	4/6/0	7/3/0	6/4/0	6/4/0	7/2/1	6/2/2	6/2/2	3/1/6	1/3/6	0/3/7
2	0/10/0	2/8/0	5/5/0	6/4/0	8/2/0	9/1/0	8/1/1	3/1/6	2/1/7	2/1/7	0/1/9
0,2	0/10/0	2/8/0	3/7/0	4/6/0	7/3/0	6/4/0	5/4/1	2/4/4	1/4/5	1/4/5	0/4/6
0,02	1/9/0	5/5/0	7/3/0	8/2/0	8/2/0	9/1/0	10/0/0	5/0/5	1/0/9	0/0/10	0/0/10

Tabelle zum Test zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der biologischen Aktivität von Do6/7. Der Zahlencode bedeutet: Tiere mit Tumor / Tiere ohne Tumor / getötete Tiere.

als die am optimalsten wirksame Dosis angesehen werden sollte, mußte daher nur nach Verzögerung und Schutz getroffen werden. Sie fiel zugunsten der Dosis von 2 µg pro Versuchstier.

Mit Do6/7 wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt, die ergab, daß in den 2 µg Einwaage 195 ng Aminosäuren enthalten waren. Somit war die spezifische Aktivität: Optimale Wirksamkeit pro 195 ng Aminosäuren.

Die mit der Ionenaustauscherchromatographie erzielte Anreicherung war rund 4000-fach gegen das Außendialysat und 400-fach gegen die Fraktion P3/4.

Die Ausbeute an Do6/7 war sehr niedrig. Aus 1 kg Ausgangsmaterial konnten nur 15 mg dieser hoch angereicherten Fraktion erhalten werden. Es war daher klar, daß für eine genauere Untersuchung der Struktur der aktiven Komponente(n) sehr große Mengen an Thymus aufgearbeitet werden mußten.

Der gesamte Trennungsgang bis zur Entsalzung der Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie ist auf Seite 35 noch einmal schematisch dargestellt.

Kalbsthymus

homogenisieren
in 0,1 m NH_4HCO_3

Homogenat

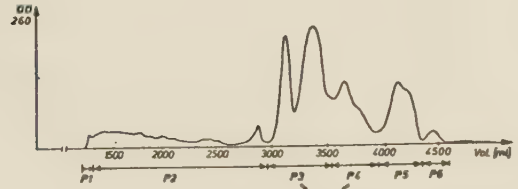
zentrifugieren
2x1 Stunde bei 3000 g

Überstand — *Sediment* wird verworfen

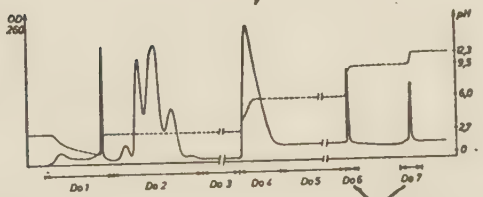
dialysieren gegen H_2O

Innendialysat wird verworfen — *Außendialysat*

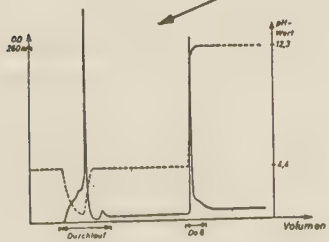
Gelpermeation
mit Biogel P2



Ionenaustauscherchromato-
graphie mit Dowex 50 WX 2



entsalzen mit
Dowex 50 WX 2



III Alternativer Trennungsgang

Obwohl der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Trennungsgang eine sehr weitgehende Anreicherung der dialysablen aktiven Komponente(n) aus Kalbsthymus gebracht hatte, wurde dennoch versucht, einen alternativen Trennungsgang zu finden, bei dem die Ausbeute insbesondere dadurch gesteigert werden sollte, daß ein Abbau durch endogene Enzyme so weit als möglich verhindert wurde. Ausschlaggebend hierfür war vor allem die Absicht noch größere Mengen an Rohmaterial aufzuarbeiten. Die Ausbeute an der hochaktiven Fraktion Do6/7 lag im Durchschnitt, wie schon beschrieben, bei 15 mg Trockengewicht pro 1 kg Thymusgewebe. Für die biologischen Tests wurde zwar stets nur sehr wenig Material benötigt, aber bei biochemischen Untersuchungen muß relativ viel Substanz eingesetzt werden, die fast immer auch verloren geht. Es war also abzusehen, daß für die weitere Arbeit an den dialysablen Thymusfaktoren noch viel Material benötigt werden würde.

Um nun größere Mengen der Fraktion Do6/7 zu erhalten, mußte der Trennungsgang so abgewandelt werden, daß vor allem drei Probleme gelöst wurden. Erstens mußte die mögliche Ausbeute so weit als möglich gesteigert werden indem verhindert wurde, daß während der Aufarbeitung aktives Material zerstört wurde, insbesondere durch den Abbau mit endogenen Enzymen, zweitens mußte der Salzgehalt der Zwischenstufen noch wesentlich weiter herabgesetzt werden und drittens mußten die verwendeten Säulen auf Abmessungen gebracht werden, die es erlaubten große Mengen an Material auf einmal und mit guter Trennwirkung aufzutragen und zu eluieren. Dieser neue Trennungsgang konnte sich jedoch nicht völlig vom alten unterscheiden, da sonst ja alle Schritte noch einmal hätten

neu erarbeitet werden müssen. Die angewendeten Methoden hätten durch Vorversuche auf ihre Tauglichkeit hin untersucht werden müssen, und es wäre nötig gewesen, die spezifischen Aktivitäten der neuen Zwischenstufen zu bestimmen und mit denen der alten zu vergleichen, um festzustellen, ob die neuen Methoden tatsächlich eine Verbesserung gebracht hätten. Deshalb wurde der alternative Trennungsgang dem ursprünglichen im Wesentlichen nachempfunden und nur die Bedingungen bei den einzelnen Schritten geändert, wenn diese Änderung sinnvoll und erfolgversprechend erschien.

a) Homogenisation und Dialyse

Die Lösung des ersten obengenannten Problems, nämlich die Verhinderung des Abbaus von aktivem Material durch natürlich im Thymusgewebe vorhandene Enzyme, mußte bei der Homogenisation und der darauffolgenden Dialyse in Angriff genommen werden. Bei der Homogenisation werden die Zellstrukturen zerstört, so daß endogene Enzyme aus ihrer physiologischen Umgebung freigesetzt werden und somit in der Lage sind, unkontrollierte Umsetzungen zu bewirken. Als Proteine bleiben diese Enzyme mit den dialysablen Substanzen zwar nur bis zur Dialyse zusammen, aber ein beträchtlicher Abbau und damit Verlust an aktivem Material kann bis dahin nicht ausgeschlossen werden.

Daher mußten die Bedingungen bei den ersten beiden Aufarbeitungsschritten so geändert werden, daß möglichst weitgehend alle Arten von Enzymen inaktiviert werden konnten, denn die Natur der aktiven Komponente(n) war ja noch nicht bekannt. Ein Zusatz von Inhibitoren kam nicht in Frage, da diese meist nur eine kleine Anzahl von Enzymen zu hemmen vermögen und da sie meist niedermolekular sind und somit nur schwer hätten wieder abgetrennt werden können. Auch eine Hitzeinaktivierung

erschien riskant, obwohl bereits gezeigt worden war, daß die biologische Aktivität des Außendialysats sich durch 30 minütiges Erwärmen auf 70°C nicht merklich verringerte. Schließlich wurde einfach der pH-Wert des Homogenats drastisch geändert. Statt des vorher verwendeten 0,1 M Ammoniumbicarbonats wurde der Thymus zusammen mit 0,1 M Essigsäure homogenisiert, wieder im Mischungsverhältnis 1 l Essigsäure zu 1 kg Thymus. Der pH-Wert des so erhaltenen 3000 g Überstands des Homogenats lag bei 4 und damit deutlich außerhalb des Bereichs, in dem die überwiegende Mehrzahl der Enzyme aktiv ist. Diese Änderung des pH-Werts hatte noch einen weiteren Vorteil. Im Sauren sind Nucleinsäuren mit längeren Ketten nicht mehr löslich. Es entstand daher ein weißes Sediment aus Nucleinsäuren, das sich sehr leicht bei 3000 g abzentrifugieren ließ. Der Überstand war eine fast klare Lösung und enthielt sehr viel weniger Nucleinsäure als der mit der alten Methode gewonnene.
Auch bei der Dialyse wurden die Bedingungen gegenüber früheren Aufarbeitungen leicht geändert. Es wurde nicht mehr gegen bidestilliertes Wasser mit Azid dialysiert, sondern gegen 0,01 M Essigsäure mit dem selben Zusatz an Natriumazid wie früher. Dadurch wurde der pH-Wert sowohl des Innen- wie auch des Außendialysats während der gesamten Dialyse bei vier gehalten, was bewirken sollte, daß die nach wie vor im Inneren der Dialyseschläuche vorhandenen Enzyme inaktiv gehalten wurden. Eine Erhöhung des Salzgehalts des Außendialysats trat nicht ein. Das erhaltene Trockenprodukt glich dem früherer Aufarbeitungen äußerlich völlig.
Eine Testreihe im biologischen Aktivitätstest, bei dem die spezifische Aktivität des neuen Außendialysats bestimmt wurde, zeigte, daß sie recht genau so hoch war wie die des alten Außendialysats, nämlich optimale Wirksamkeit pro 0,5 mg Aminosäuren unter Standardapplikationsbedingungen (hierzu siehe Seite 13). Diese

Aminosäuren waren jedoch in einer Einwaage von nur 1 mg enthalten, was bedeutet, daß mit der alternativen Präparationsmethode bereits ein Außendialysat mit höherer biologischer Aktivität erhalten werden kann.

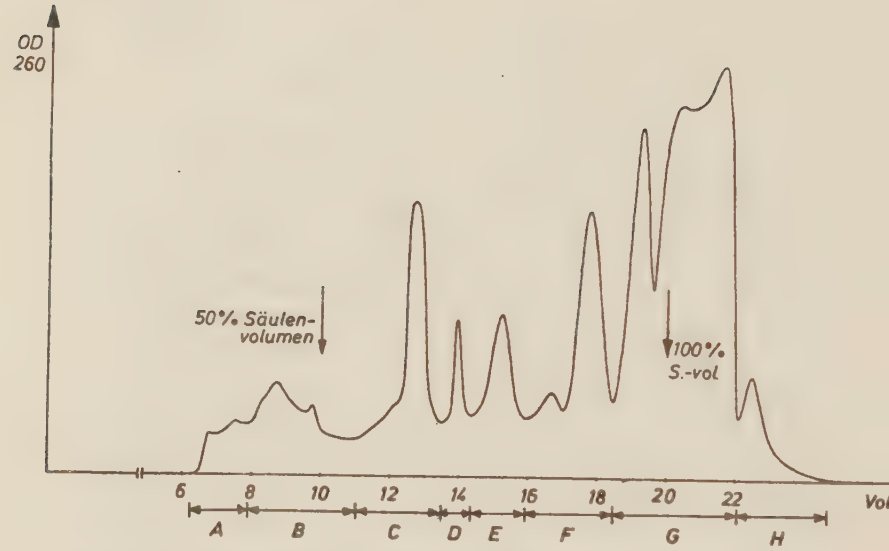
b) Gelpermeation mit Biogel P2 und Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2

Eine starke Veränderung der Aufarbeitungsmethode wurde bei der Gelpermeation mit Biogel P2 vorgenommen. Die Dicke der verwendeten Säule war beträchtlich größer. Der Durchmesser betrug 10 cm und die Länge war 250 cm. Das Volumen des gepackten Gels betrug 20 l. Auch der Elutionspuffer wurde gegenüber den früheren Aufarbeitungen geändert. Es wurde jetzt 0,01 M Ammoniumacetat/Ammoniak pH 8,0 mit einem Zusatz von 0,02% Natriumazid verwendet. Dieses System erlaubte es, 20 g Außendialysat in 50 ml auf einmal aufzutragen. Die erhaltenen Fraktionen waren wesentlich salzärmer als die früher mit 0,1 M Ammoniumbicarbonat als Elutionspuffer erhaltenen.

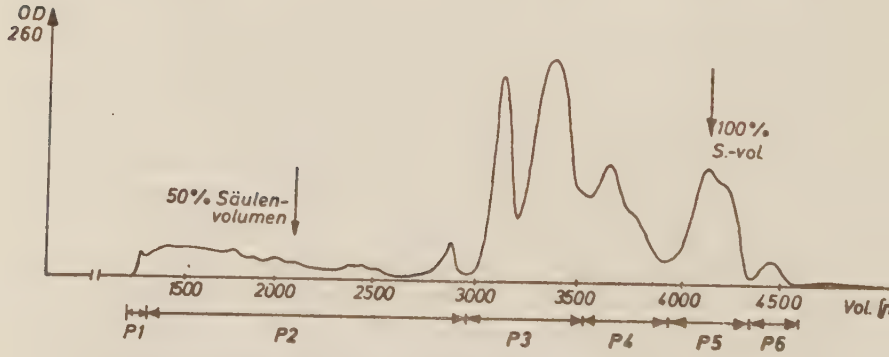
Die Trennung mit dem neuen System verlief bezüglich der Elutionsdiagramme nicht identisch mit den früheren Trennungen. Dies war jedoch ein erwarteter Effekt. Bei einer so starken Herabsetzung der Ionenstärke im Elutionspuffer mußten sich die aufgetragenen Komponenten anders verhalten. Insbesondere Nucleinsäuren werden ja durch die Ionenstärke sehr stark in ihrem Löslichkeits- und Assoziationsverhalten beeinflußt. Im Bild 11 ist ein Elutionsdiagramm wiedergegeben, wie es vom automatischen Durchflußphotometer bei 254 nm aufgezeichnet wurde. Diesem Diagramm wurde eines gegenübergestellt, das mit dem früher angewendeten Säulensystem erhalten worden war. Die Fraktionierung erfolgte gemäß der Eintragung.

Die beiden in Bild 11 wiedergegebenen Diagramme zeigen

Bild 11:



Elutionsdiagramm der Biogel P2 Säule, die im alternativen Trennungsgang verwendet wurde. Der Elutionspuffer war 0,01 m Ammoniumacetat/Ammoniak pH 8,0



Elutionsdiagramm der Biogel P2 Säule, die im ursprünglichen Trennungsgang verwendet wurde. Der Elutionspuffer war hier 0,1 m Ammoniumbicarbonat. Das Diagramm ist dem obenstehenden zum Vergleich gegenübergestellt.

deutlich, worin sich die mit den beiden alternativen Präparationsmethoden erhaltenen Säulentrennungen unterscheiden. In beiden Fällen erfolgt die Elution von absorbierendem Material zwischen 30 und 105% Säulenvolumen. Der Bereich des Elutionsdiagrammes, in dem die Absorption des von 50 bis 100% Säulenvolumen eluierten Materials aufgezeichnet ist, zeigt die größten Unterschiede. Bei der neuen Methode werden in diesem Abschnitt mehr und deutlicher abgesetzte Absorptionsmaxima sichtbar. Offensichtlich werden die Komponenten, die im Eluat des früheren Systems zwischen 70 und 100% Säulenvolumen erscheinen, stärker auseinandergezogen.

Mit den Fraktionen der neuen Biogel P2 Säule wurde nun ein Test auf biologische Aktivität durchgeführt. Dieser zeigte, daß die Aktivität in den Fraktionen D, E und F und in sehr geringem Maß in der Fraktion G zu finden war. Daraufhin wurden die Fraktionen D bis F vereinigt und als neues P3/4 in der weiteren Reinigung mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie eingesetzt. Der Verlust eines kleinen Teils der biologischen Aktivität beim Verwerfen der Fraktion G wurde in Kauf genommen, um nicht unnötig viel zusätzliche Ballaststoffe in der Aufarbeitung mitzuschleppen, denn bei dem geringen Gehalt an aktiven Komponenten, den G haben dürfte, mußte der weit überwiegende Teil der Fraktion aus unerwünschten inaktiven Substanzen bestehen. Eine Bestimmung der spezifischen Aktivität der neuen Mischfraktion P3/4 wurde nicht vorgenommen. Die Aminosäurenanalyse ergab jedoch, daß die Fraktion über 40% Aminosäuren enthielt. Da gleichzeitig noch sehr viel Harnstoff und Glycin im Totalhydrolysat von P3/4 zu finden war, mußte die Fraktion auch einen beträchtlichen Nucleinsäureanteil enthalten. Im Vergleich dazu hatte der Gehalt der alten Fraktion P3/4 weniger

als 10% an Aminosäuren betragen. Auch der Nucleinsäureanteil mußte nach Schätzungen in dieser Größenordnung gelegen haben. Der Gehalt der alten Fraktion P3/4 an Salzen lag damit wesentlich höher als bei der neuen. Das Verhältnis zwischen Salz und Komponenten hatte sich gerade umgekehrt.
In den untersuchten biochemischen Eigenschaften (dünnschichtchromatographisches Verhalten und Ultraviolettlicht-Spektrum) stimmte die neue Fraktion P3/4 genau mit der alten überein, so daß die Charakterisierung nicht gesondert beschrieben werden muß.
Bei der Ionenaustauscherchromatographie, die der Gelpermeation folgte, wurde genauso vorgegangen wie bisher. Eine Vergrößerung der Säule war auch bei der Aufarbeitung großer Mengen von Thymus nicht notwendig, da, wie schon gesagt, P3/4 kaum Salz enthielt und deshalb die Kapazität des Austauschermaterials praktisch vollständig für die Bindung der Komponenten zur Verfügung stand. Die einzige Veränderung gegenüber früher wurde bei der Elution der aktiven basischen Fraktionen vorgenommen. Anstatt durch zwei Stufen mit pH 9,5 und mit Ammoniak wurde das basische Material, das bei pH 6,0 die Säule nicht verlassen hatte, mit einer einzigen Stufe eluiert und zwar mit 1,2 M Ammoniak.
Diese wieder mit Do6/7 bezeichnete Fraktion unterschied sich biochemisch überhaupt nicht von der früher durch Mischen von Do6 und Do7 erhaltenen und war auch in ihrer spezifischen Aktivität im biologischen Test der alten gleich.

IV Biochemische und enzymatische Charakterisierung der aktiven Fraktionen

Nachdem die biologischen Tests gezeigt hatten, daß bei der Ionenaustauscherchromatographie mit Dowex 50 WX 2 bereits eine beträchtliche Anreicherung der aktiven Komponente(n) erzielt worden war, wurde zunächst versucht, die aktiven Fraktionen der verschiedenen Aufarbeitungsstufen biochemisch zu charakterisieren und in einigen Punkten mit den inaktiven Fraktionen zu vergleichen. Diese Charakterisierungen wurden mit Hilfe der folgenden Verfahren durchgeführt:

a) analytische Dünnschichtchromatographie auf mit Kieselgel beschichteten Platten unter Anwendung verschiedener Laufmittel und Methoden der Sichtbarmachung der Komponenten
b) Aufnahme von Absorptionsspektren im ultravioletten Licht bei Wellenlängen von 215 bis 340 nm
c) Abbauversuche mit verschiedenen Enzymen wie Desoxyribonucleasen, Ribonucleasen und Proteasen mit anschließenden Aktivitätskontrollen, bei denen festgestellt werden sollte, welche Enzyme in der Lage sind, die biologische Aktivität zu zerstören

Die Auswahl der angeführten Methoden wurde vor allem deshalb so vorgenommen, weil bei ihrer Anwendung nur wenig Material zerstört wurde und somit verloren ging.

a) Analytische Dünnschichtchromatographie

Die Durchführung der analytischen Dünnschichtchromatographie erfolgte ausschließlich auf Platten, die mit Kieselgel beschichtet waren. Als mobile Phasen kamen die drei folgenden Lösungsmittelgemische zur Anwendung:

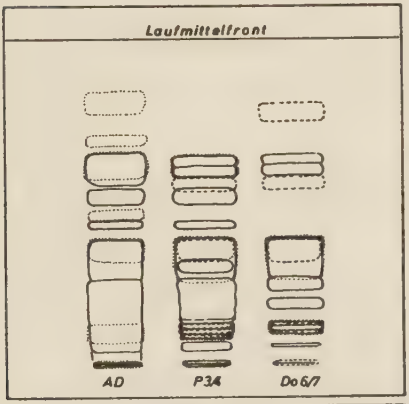
Nr. 1 Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser = 14/3/15/8

Nr. 2 Aceton/Eisessig/n-Butanol/5% Ammoniak/Wasser = 25/15/35/15/10[37]

Nr. 3 Eisessig/n-Butanol/Wasser = 6/24/10[37]

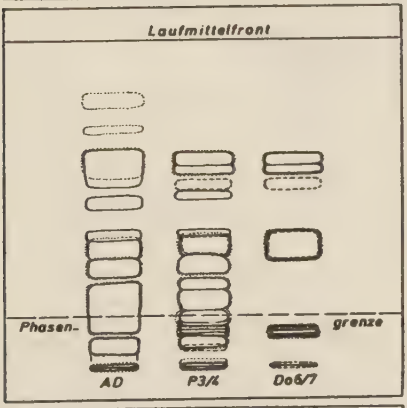
Nach dem Entwickeln wurden die Chromatogramme zunächst mit dem Föhn getrocknet. Danach wurden sie unter ultraviolettem Auflicht betrachtet und die Position hell fluoreszierender Flecken mit Bleistift markiert. Es wurde weiter mit Ninhydrin-Sprühreagenz besprüht und im Trockenschrank bis zur maximalen Ausbildung der Flekken auf 110°C erhitzt. Auch die mit Ninhydrin erzeugten Flecken wurden markiert. Schließlich wurden die Chromatogramme 10 Minuten lang in eine Chlorgasatmosphäre gebracht. Zum Entfernen des nicht gebundenen Chlors wurde zuerst 2 Stunden auf 60°C im Trockenschrank erwärmt und dann 2 Tage bei Raumtemperatur liegen gelassen. Die Färbung erfolgte durch Besprühen mit einer Lösung von 1% Stärke und 1% Kaliumjodid in Wasser.
Bei der Beurteilung der Chromatogramme zeigte sich, daß die besten Trennergebnisse mit dem Laufmittel Nr. 1 erzielt worden waren. Bild 11 zeigt nebeneinander die Chromatogramme der aktiven Fraktionen, die nacheinander im Verlauf der Aufarbeitung aus Kalbsthymus erhalten wurden. Die Auftrennung der Komponenten war mit Nr. 1 klarer als mit den beiden anderen Lösungsmittelgemischen. Außerdem bildeten sich bei Laufmittel Nr. 2 und Nr. 3 auf den Platten während der Entwicklung Phasengrenzen aus.
Aus Bild 12 wird ersichtlich, daß die in den aktiven Fraktionen enthaltenen Komponentengemische zwar von Stufe zu Stufe weniger komplex werden, daß aber trotzdem auch die aktivste und best gereinigte Fraktion Do 6/7 noch aus mehr als 10 Einzelkomponenten zusammengesetzt ist.
In Bild 13 sind die Fraktionen, die beim vorläufig letzten Schritt des Trennungsganges erhalten wurden, nämlich die Fraktionen Do1, Do4, Do6 und Do7 noch zum Vergleich nebeneinandergestellt. Dieses Chromatogramm wurde mit dem Laufmittel Nr. 1 aufgenommen. Auf die Wiedergabe

Bild 12: Dünnschichtchromatographie der aktiven Fraktionen Außendialysat, P3/4 und Do6/7

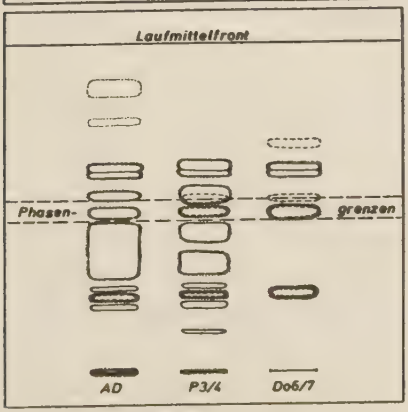


Chromatogramm mit Laufmittel Nr. 1
Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser = 14/3/15/8

------= UV-Fluoreszenz
———= Ninhydrin-Färbung
–·–·–= Chlorox



Chromatogramm mit Laufmittel Nr. 2
Aceton/Eisessig/n-Butanol/5% Ammoniak/Wasser
= 25/15/35/15/10



Chromatogramm mit Laufmittel Nr. 3
Eisessig/n-Butanol/Wasser
= 6/24/10

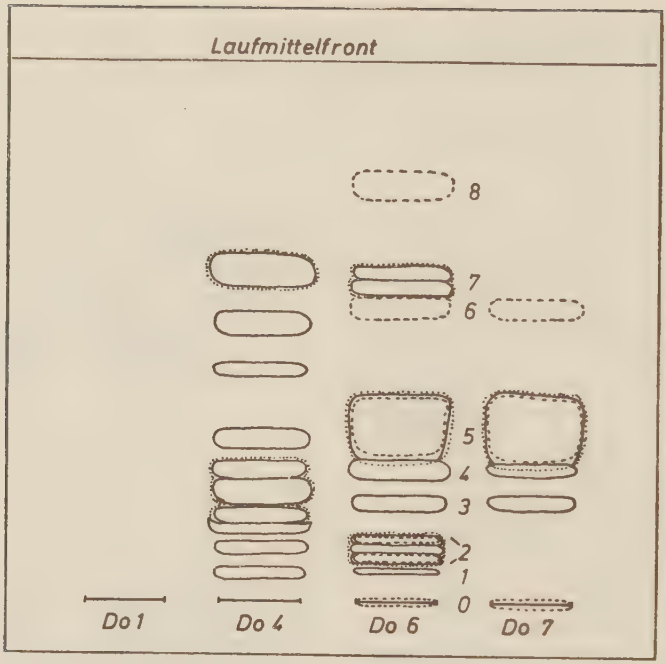


Bild 13: Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie über Dowex 50 WX 2. Laufmittel war das Gemisch Nr. 1 Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser = 14/3/15/8 -----= UV-Fluoreszenz, ——= Ninhydrin-Färbung, ·····= Chlorox.
Durch Vergleich mit entsprechenden Referenzen wurde festgestellt, daß die Dreierbande **2** aus den basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin bestand. Die Doppelbande **7** bestand aus Tyrosin und Phenylalanin.

der entsprechenden Chromatogramme der Laufmittel Nr. 2 und Nr. 3 wurde verzichtet, da, wie schon gesagt, mit dem Gemisch Nr. 1 die besten Trennergebnisse erzielt worden waren.

Bild 13 zeigt, daß die Fraktionen Do6 und Do7 weitgehend die selben Komponenten enthalten. Dies war nach den biologischen Tests auch zu erwarten. Mit der Fraktion Do4 ist jedoch praktisch keine Überschneidung im

Fleckenmuster vorhanden. Bei der Fraktion Do1 konnten mit den angewendeten Methoden keine Flecken sichtbar gemacht werden.
Die Flecken der beiden Fraktionen, die biologisch aktive Komponenten enthalten mußten, nämlich Do6 und Do7 wurden mit Zahlen von 0 bis 8 gekennzeichnet. Die Nummerierung ist in Bild 13 eingetragen. Da schon bekannt war, daß die Mischfraktion Do6/7 freie Aminosäuren enthielt und auch welche dies waren, wurden Chromatogramme entwickelt, bei denen neben Do6 und Do7 die entsprechenden Aminosäuren als Referenzen aufgetragen wurden. Dabei zeigte sich, daß die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin in dem mit 2 bezeichneten Dreierfleck saßen. Der mit 7 bezeichnete Doppelfleck bestand aus Tyrosin und Phenylalanin. Weitere freie Aminosäuren traten nicht in den aktiven Fraktionen auf.
Aus den Fleckenmustern der beiden biologisch aktiven Fraktionen Do6 und Do7 lassen sich einige Erkenntnisse über die aktive(n) Komponente(n) gewinnen. Nucleinsäuren verraten sich durch ihre stets starke Fluoreszenz im ultravioletten Licht. Demnach mußten die Flecken 0, 6 und 8 Nucleinsäure beinhalten. Da die anderen fluoreszierenden Flecken durchweg auch mit Ninhydrin und Chlorox sichtbar gemacht werden konnten, mußten sie gleichzeitig auch noch Peptide oder freie Aminosäuren enthalten. Die freien Aminosäuren waren jedoch bereits bekannt, so daß nur der Fleck 5 mit Doppelnatur übrig blieb. Die nur mit Ninhydrin positiven Flecken 3 und 4 konnten dennoch Peptide sein, da sie mit Ninhydrin stets nur schwache Färbungen ergaben und somit angenommen werden muß, daß sie nur in geringer Konzentration in den Fraktionen vorhanden waren.
Die aktive(n) Komponente(n) konnten mit Hilfe der analytischen Dünnschichtchromatographie noch nicht identifiziert werden. Als mögliche Stoffe kommen die in den

Flecken 0, 3, 4, 5 und 6 enthaltenen Komponenten in Frage. Alle anderen Komponenten sind entweder freie Aminosäuren oder nur in Do6 enthalten. Da jedoch Do6 und Do7 in gleicher Art und praktisch gleich stark biologisch aktiv sind, kommen nur solche Komponenten als aktive in Frage, die in beiden Fraktionen enthalten sind.

b) Absorptionsspektren im ultravioletten Licht

Jeweils unmittelbar vor Beginn einer biologischen Testreihe wurden von den eingesetzten Fraktionen Absorptionsspektren im ultravioletten Licht bei Wellenlängen von 215 bis 340 nm aufgenommen. In den Bildern 14 bis 16 sind die Spektren der interessantesten Fraktionen abgebildet. Bild 17 zeigt die Spektren des Außendialysats, der Fraktion P3/4 und von Do7 noch einmal in einem einzigen Diagramm.

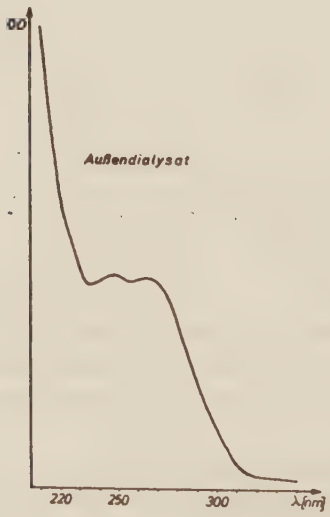


Bild 14: UV-Spektrum des Außendialysats

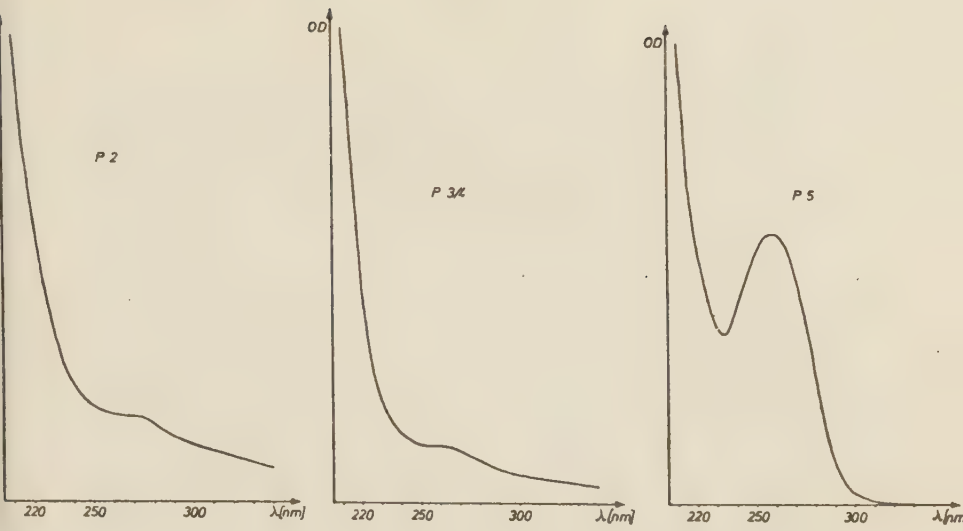


Bild 15: UV-Spektren der Fraktionen der Biogel P2 Säule

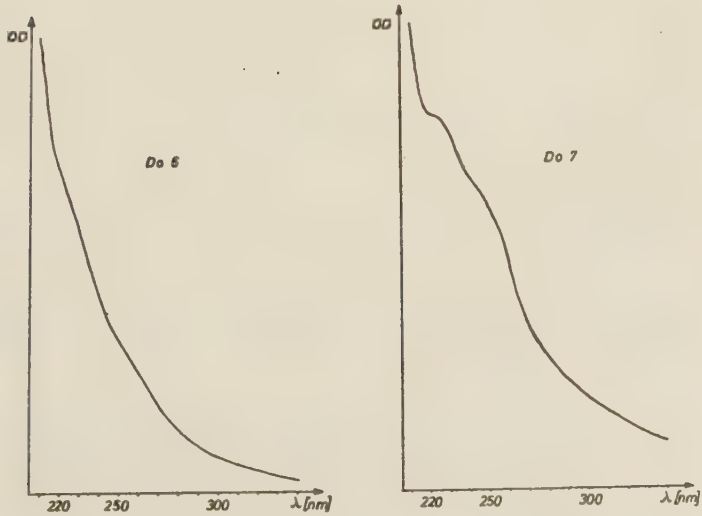


Bild 16: UV-Spektren der aktiven Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie über Dowex 50 WX 2

Bild 17: UV-Spektren der biologisch aktiven Fraktionen, die bis zur Stufe der Ionenaustauscherchromatographie erhalten wurden. Die Kurve für P3/4 wurde so korrigiert, daß sie die Absorption auf den selben Aminosäurengehalt bezieht, den auch die beiden anderen Fraktionen hatten, das heißt, sie wurde mit etwa der dreifachen Einwaage aufgenommen.

Aus den abgebildeten Spektren läßt sich einiges über den Verlauf der Trennung ablesen. Wie Bild 14 zeigt, enthält das Außendialysat Materialien, die zu Absorptionsmaxima bei 250 und 280 nm führen. Auch eine geringe Absorption bei 220 bis 230 nm läßt sich aus dem Spektrum gerade noch erkennen. Die Spektren der Fraktionen der Biogel P2 Säule sind etwas schwerer zu deuten. Insbesondere die Fraktionen P2 und P3/4 enthalten große Mengen an nicht absorbierendem Material vor allem an Salzen. Dadurch kommt die Absorption der Komponenten nicht so deutlich zum Ausdruck. Trotzdem ist aber zu erkennen, daß die bei 260 nm stark absorbierenden Nucleinsäuren in Fraktion P5 zu finden sind, zumindest der überwiegende Anteil von ihnen. Das bei 280 nm absorbierende Material scheint dagegen vor allem in Fraktion P2, aber auch in P1 zu finden zu sein, deren Spektrum hier nicht abgebildet wurde.
Wie schon die biologischen Tests gezeigt hatten, geht auch aus den Spektren hervor, daß der größte Reinigungseffekt bei der Ionenaustauscherchromatographie über Dowex 50 WX 2 erzielt worden war. Bei gleicher Einwaage zeigen die Spektren der beiden aktiven Fraktionen ihr Absorptionsverhalten stärker als die Fraktionen der Biogel P2 Säule, was auf den weit geringeren Anteil an nicht absorbierendem Material zurückzuführen ist. Vor allem bei der Fraktion Do7 ist eine deutliche Schulter im Spektrum bei 230 nm zu erkennen und eine schwächer ausgeprägte bei 250 bis 260 nm. Beide Schultern zeigen sich wenn auch wesentlich weniger deutlich ausgeprägt bei Fraktion Do6. Beide Absorptionsarten durften auf Grund der analytischen Dünnschichtchromatographie erwartet werden, denn diese hatte ja gezeigt, daß in den beiden Fraktionen Peptidbindungen mit Absorption bei 230 nm und Nucleinsäureanteile mit Absorption bei 254 nm vorhanden sind.

c) Enzymatische Abbauversuche

Die Versuche mit Enzymen die aktive(n) Komponente(n) abzubauen, das heißt ihre biologische Aktivität zu zerstören, sollten zeigen, zu welcher Klasse von biologischen Molekülen sie gerechnet werden mußte(n). In den Versuchen eingesetzt wurden die folgenden Enzyme: Desoxyribonuclease I, die Ribonucleasen A und T_1, sowie Pronase und Chymotrypsin als Proteasen. Als aktive Fraktion kam ausschließlich die sehr weitgehend gereinigte Fraktion Do6/7 in die Versuchsreihe.

Nachdem schon bekannt war, in welcher Dosierung Do6/7 seine biologische Aktivität am deutlichsten zeigen konte, wurden zur Behandlung mit den Enzymen gerade so große Mengen eingesetzt, daß in einem anschließenden Aktivitätstest eine optimale Dosis oder das zerstörte Äquivalent einer solchen Dosis für jedes Versuchstier zur Verfügung stand. Die einzelnen Portionen von Do6/7 wurden nun mit jeweils einem der Enzyme 1 Stunde lang unter Zugabe der für das Enzym notwendigen Ionen bei 37°C inkubiert. Die genauen Bedingungen sind in Teil E beschrieben. Eine zusätzliche Portion Do6/7 wurde ohne Enzym ebenfalls 1 Stunde lang auf 37°C erwärmt. Dieses Material diente als Temperaturkontrolle. Nach der Inkubation wurde zum Stoppen der Reaktion zunächst bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Enzyme mit Hilfe einer Gelpermeation über Biogel P2 abgetrennt. Die verwendete Säule hatte die Maße 0,8 x 10 cm. Als Elutionsmedium diente bidestilliertes Wasser. Die Ausschlußfraktionen der Eluate wurden abgetrennt und verworfen. Das übrige Material wurde gefriergetrocknet und in der für den biologischen Test geeigneten Konzentration in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte der Aktivitätstest.

Dieser Aktivitätstest sollte klären, ob und wie sich die biologische Aktivität der Fraktion Do6/7 durch die

Behandlung mit den einzelnen Enzymen verändert hatte. Hierbei waren mehrere Auswirkungen der Enzymbehandlung möglich. Außer einer völligen Zerstörung jeglicher Art von Aktivität oder einer Wirkungslosigkeit der Enzyme konnte es ja auch möglich sein, daß die Art der Aktivität verändert worden war. Wie sich schon in den früheren Versuchen gezeigt hatte, waren alle aktiven Fraktionen in der Lage gewesen, das Wachstum der transplantierten Tumore zu beschleunigen, aber auch zu verlangsamen, bis hin zur Regression und damit zum Überleben der Versuchstiere. Die Art der Aktivität war dabei als konzentrationsabhängig erkannt worden. Bei einem Zwei- oder Mehrkomponentensystem konnte es nun auch möglich sein, daß durch enzymatischen Abbau nur eine der Komponenten zerstört wurde und sich somit nur der Effekt verlor, der auf die betreffende Komponente zurückzuführen war.
Die Ergebnisse des Versuchs sind in den Bildern 18 bis 20 dargestellt. Dabei wurde der Test so aufgeschlüsselt, daß jeweils die Ergebnisse der Behandlung mit zur selben Klasse gehörenden Enzymen der Kontrolle und dem nicht behandelten Do6/7 gegenübergestellt sind. Sie sollen auch im Einzelnen besprochen werden.
Wie aus allen Bildern zu ersehen ist, waren die Tumore der Kontrollgruppe zwischen dem 12. und 30. Tag erstmalig auffindbar geworden. Der Übertritt in die Phase des progressiven Wachstums erfolgte im Schnitt um den 35. Tag herum, erkennbar daran, daß die Balken im Diagramm dort enden, denn die Tiere wurden ja, wie auf Seite 7 beschrieben, dann getötet, wenn der Tumor 1 cm Durchmesser erreicht hatte und damit gerade deutlich in diese letzte Phase des Tumorwachstums eingetreten war. Ein Verhalten der Kontrolltumore wie in diesem Versuch war sehr wünschenswert, denn es konnten in einem solchen Versuch sowohl verzögernde als auch beschleunigende Aktivität gut gemessen werden.

Die Bilder 18 und 20 zeigen auch, daß die unbehandelte Fraktion Do6/7 in diesem Versuch ausschließlich ihre Fähigkeit zur Beschleunigung des Wachstums der STU-D17-Tumore gezeigt hatte. Offenbar war die angewendete Dosis doch etwas zu hoch gewesen. Das Maß der Beschleunigung ist ziemlich hoch. In der ersten avaskulären Phase wuchsen die Tumore mehr als zweimal so schnell wie die Kontrolltumore. Der Übertritt in die progressive Wachstumsphase erfolgte ebenfalls deutlich früher als bei den Kontrollen.
Die Behandlung von Do6/7 mit Desoxyribonuclease I hatte keinen merklichen Einfluß auf die biologische Aktivität der Fraktion. Dies ist aus der Abbildung 18 zu ersehen. Auch bei der Versuchsgruppe, die desoxyribonucleasebehandeltes Do6/7 erhalten hatte, wuchsen die Tumore mehr als zweimal so schnell wie bei der Kontrollgruppe. Das entsprechende Diagramm glich fast völlig dem der Gruppe, die Do6/7 ohne Enzymbehandlung erhalten hatte.

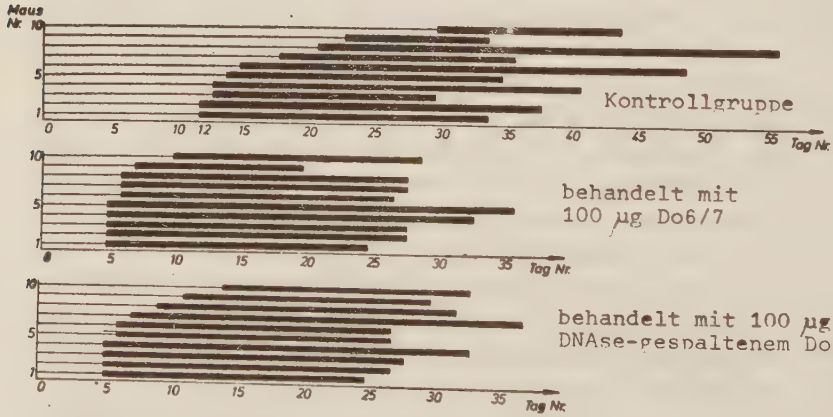


Bild 18: Test auf biologische Aktivität von Do6/7 nach Behandlung mit Desoxyribonuclease.

Im Gegensatz zur Behandlung mit Desoxyribonuclease I hatte sowohl die Inkubation mit den beiden Ribonucleasen als auch mit den beiden Proteasen das Verhalten der Fraktion Do6/7 im biologischen Test stark verändert. Dies zeigen die Bilder 19 und 20.

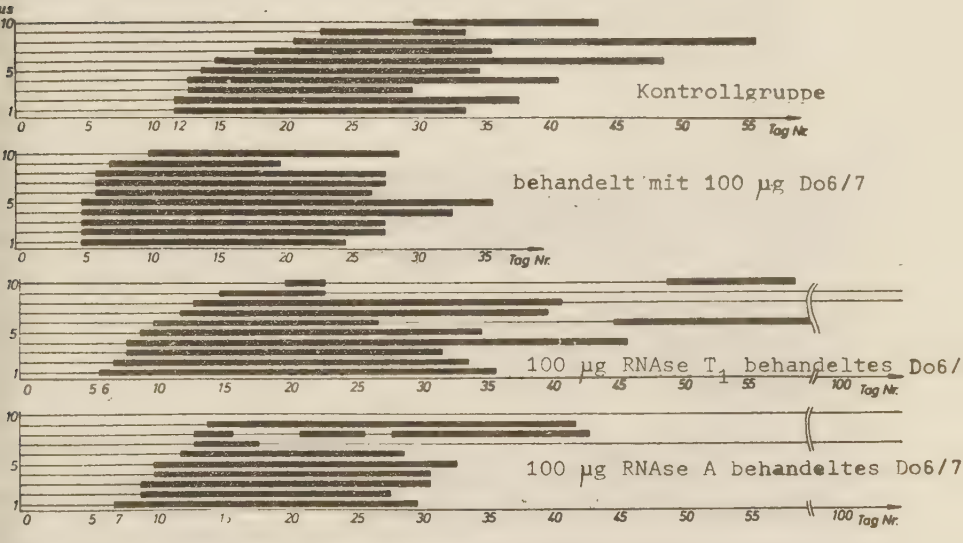


Bild 19: Test auf biologische Aktivität von Do6/7 nach Behandlung mit verschiedenen Ribonucleasen

Wie Bild 19 zeigt, unterschieden sich die Diagramme der Versuchsgruppen, die ribonucleasebehandeltes Do6/7 erhalten hatten, beträchtlich von dem der Gruppe, die mit unzerstörtem Do6/7 behandelt worden war. Die Tumore erschienen nicht so schnell, wenn auch noch deutlich früher als bei den Kontrolltieren. Es gab Regressionen und Tiere, die überhaupt keine Tumore von feststellbarer Größe entwickelten. Allerdings unterschieden sich die beiden Diagramme noch ebenso erheblich von dem der Kontrolltiere.

Praktisch die selben Effekte wie durch Behandlung von

Do6/7 mit Ribonuclease wurden durch Behandlung der Fraktion mit den beiden Proteasen erreicht. Auch hierdurch unterschieden sich die entsprechenden Diagramme erheblich von dem der Gruppe, die das unbehandelte Do6/7 erhalten hatte. Bild 20 zeigt die entsprechenden Diagramme. Auch qualitativ waren die selben Unterschiede zu beobachten, die schon bei den Diagrammen der Gruppen aufgefallen waren, die ribonucleasebehandeltes Do6/7 erhalten hatten.

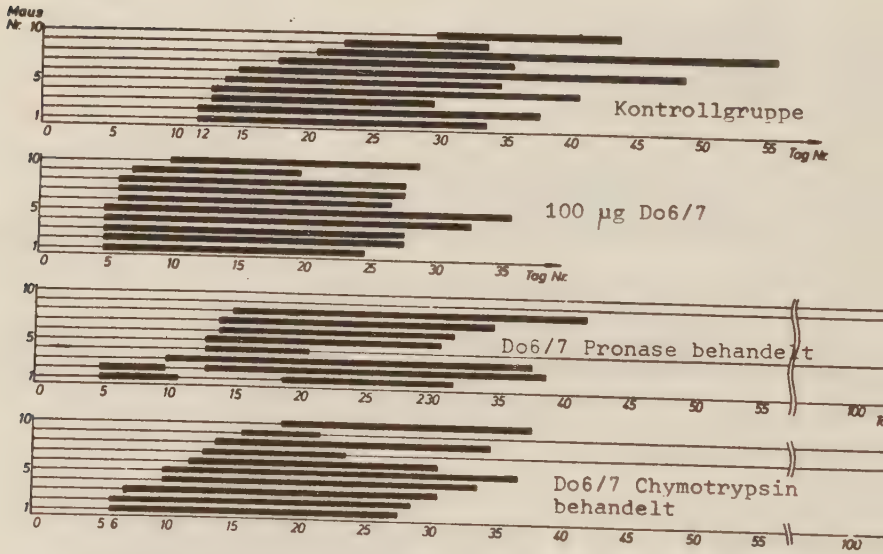


Bild 20: Test auf biologische Aktivität von Do6/7 nach Behandlung mit verschiedenen Proteasen

Nach diesen Versuchen war klar, daß die aktive Komponente, sofern es sich um eine einzige handelte, gleichzeitig Ribonucleotid- und Peptidbindungen enthalten mußte. Die Beeinflussung der biologischen Aktivität von Do6/7 durch Pronase zeigt sogar, daß das aktive Molekül

Prolin enthalten mußte. Die gleichzeitige Anwesenheit von Peptid- und Nucleotidbindungen zeigt sich auch im Ultraviolettlicht-Spektrum. Vor allem Do7 zeigt ja gerade in den zwei Bereichen Absorption, in denen Peptidbindungen und Nucleinbasen absorbieren. Die Wahrscheinlichkeit, daß die beiden verschiedenartigen Anteile auf zwei verschiedene Moleküle verteilt sind, daß also zwei Faktoren vorliegen, von denen der eine eine Ribonucleinsäure und der andere ein Peptid ist, erscheint nicht sehr hoch zu sein. Reine Nucleinsäuren werden auf Dowex 50 WX 2 nicht so fest gebunden, daß sie nur durch hohe Mengen Ammoniak zu verdrängen sind. Sie müssen sich daher im Durchlauf befinden, sofern sie, wie das bei niederen Oligonucleotiden der Fall ist, im Sauren genügend löslich sind. Längerkettige Nucleinsäuren, die zwar auch nicht fest auf dem stark sauren Dowex 50 WX 2 gebunden werden, können im Sauren wegen ihres Löslichkeitsverhaltens noch nicht eluiert werden. Die Elution solcher Nucleinsäuren erfolgte bei der Chromatographie unmittelbar an der Front mit pH 6,0 und war auch makroskopisch leicht zu verfolgen. Es zeigte sich nämlich stets eine Bande von weißem, ausgefallenen Material, die die Säule mit dem pH-Sprung auf 6,0 verließ.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich bei der aktiven Komponente um einen einzigen Stoff handelt, lieferten die stets parallel durchgeführten Aminosäurenanalysen. Es wurde nie eine Fraktion gefunden, die in irgend einer Weise aktiv war und frei von Aminosäuren. Zusätzlich kann ein Gehalt an Nucleinsäuren ebenfalls mit Hilfe der Aminosäurenzusammensetzung erkannt werden, da in Hydrolysaten von Nucleinsäure enthaltenden Fraktionen stets außergewöhnlich hohe Mengen an Glycin und immer eine geringe Menge Harnstoff zu finden ist. Beides ist

Produkt des Nucleinsäureabbaus. in allen aktiven Fraktionen wurde aber auf diese Weise die Anwesenheit von Nucleinsäuren angezeigt. Somit erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die aktive Komponente ein Peptid- und ein Nucleinsäureende besitzt.
Da es im vorher beschriebenen Versuch nicht gelungen war, die biologische Aktivität der Fraktion Do6/7 völlig zu zerstören, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem außer einer Bestätigung der schon beschriebenen Befunde vor allem versucht wurde, das Maß des Abbaus durch Ribonucleasen und proteasen in etwa zu bestimmen. Diesmal kamen nur Desoxyribonuclease I, Ribonuclease A und Chymotrypsin als Enzyme zum Einsatz. Die Inkubationsbedingungen wurden wie im vorangegangenen Versuch gewählt, mit der Ausnahme, daß auf die Abtrennung der Enzyme nach der Inkubation verzichtet wurde. Außerdem wurde die Dosis des nicht enzymbehandelten Do6/7 sowie der behandelten Fraktionen um die Hälfte erniedrigt, um aus dem Bereich zu kommen, in dem sehr starke Beschleunigung des Tumorwachstums auftritt.
Mit in den Versuch genommen wurden noch drei Gruppen von Mäusen, die unbehandeltes Do6/7 in absteigenden Mengen erhielten. Die eingesetzten Dosen wurden dabei so abgestuft, daß die nächst niedrigere sich von der vorhergehenden um den Faktor 1/10 unterschied, so wie das auch bei der Bestimmung der Mengenabhängigkeiten schon durchgeführt worden war. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Bild 21 und 22 dargestellt.
Wie aus beiden Bildern zu ersehen ist, waren diesmal die Tumore der Kontrollgruppe sehr schnell gewachsen. Die ersten erschienen bereits am 4. Tag nach der Transplantation der STU-D17-Zellen. Dadurch war es natürlich unmöglich beschleunigende Aktivität zu finden. Die höchste Dosis Do6/7 zeigte diesmal ihre Aktivität vor allem

dadurch, daß drei Versuchstiere in die Lage versetzt wurden, ihre Tumore auflösen zu können.
Wie Bild 21 zeigt, hatte die Behandlung von Do6/7 mit Desoxyribonuclease wieder zu keiner merklichen Veränderung der biologischen Aktivität der Fraktion geführt. Auch in diesem Versuch unterschied sich das Diagramm der Versuchsgruppe, die Do6/7 nach Inkubation mit dem Enzym erhalten hatte, nicht von dem der Gruppe, die unzerstörtes Do6/7 bekommen hatte.

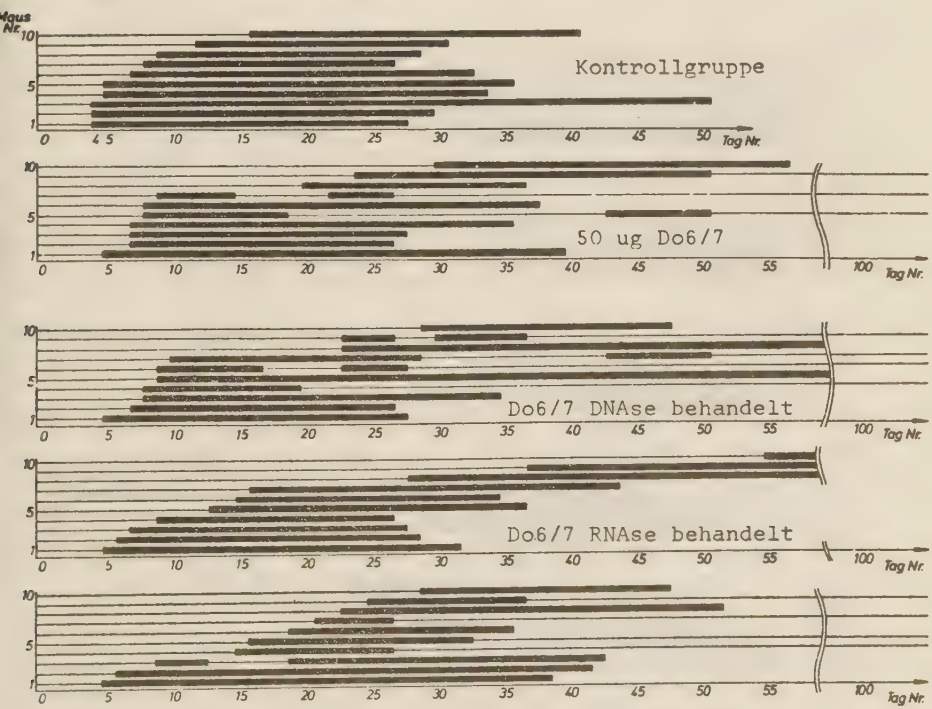


Bild 21: Test auf biologische Aktivität der Fraktion Do6/7 nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen. Die zuunterst angeführte Versuchsgruppe erhielt Do6/7 mit Chymotrypsin behandelt.
▬▬▬ = Tier trägt feststellbaren Tumor.

Weiter ist aus Bild 21 zu ersehen, daß die Behandlung mit Ribonuclease und Protease wieder zu einer charakteristischen Veränderung der entsprechenden Diagramme gegenüber dem der Gruppe mit unbehandeltem Do6/7 geführt hatte. In beiden Fällen wurden die Tumore später feststellbar, was einem verzögerten Wachstum entspricht. Es war auch wieder nicht gelungen, die biologische Aktivität vollständig zu zerstören, was aus dem Unterschied zum Diagramm der Kontrollgruppe hervorgeht.

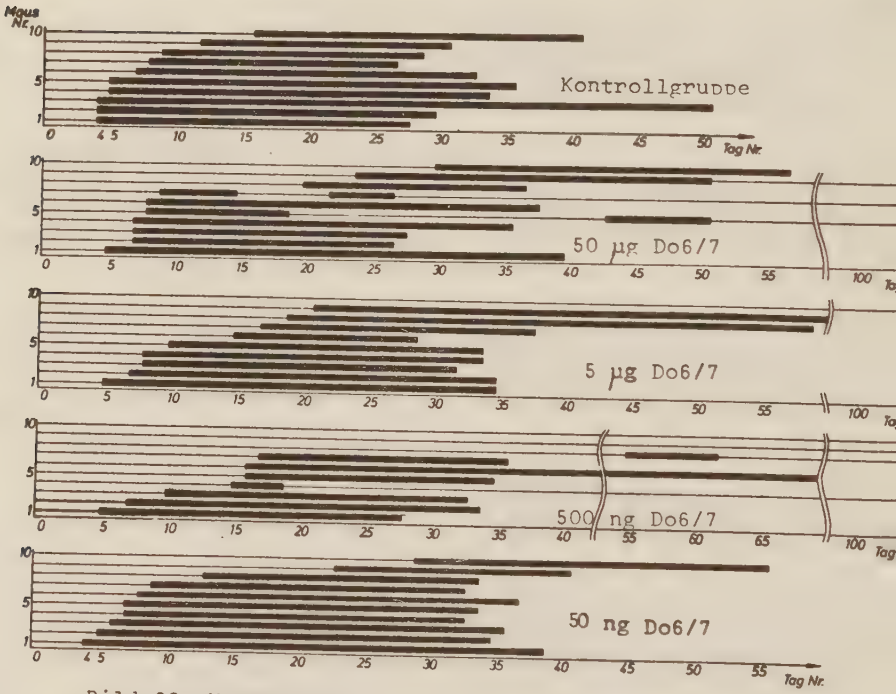


Bild 22: Konzentrationsreihe der Fraktion Do6/7 im biologischen Test.

Die Konzentrationsreihe, die zum Vergleich und zur Bestimmung des Maßes des Abbaus mit in den Versuch genommen worden war ist in Bild 22 dargestellt. Ein Vergleich

zwischen den Diagrammen der Abbildungen 21 und 22 zeigt, daß die einstündige Inkubation von Do6/7 mit Chymotrypsin so viel der biologischen Aktivität zerstört hatte, daß die Restaktivität der entsprach, die eine hundertfach niedrigere Dosis auszuüben im Stande war. Das Diagramm der Gruppe, die 5oo ng erhalten hatte und das der Gruppe, die das mit Chymotrypsin behandelte Do6/7 bekommen hatte, waren einander sehr ähnlich. Das Auftauchen der ersten Tumore vollzog sich gleichartig und es überlebten die selbe Anzahl von Tieren.
Wie stark der Aktivitätsverlust bei Abbau mit Ribonuclease war, kann dagegen nicht mit Sicherheit gesagt werden. Das entsprechende Diagramm ähnelt zwar dem der Gruppe, die 5 µg Do6/7 erhalten hatte, also 1/10 der Ausgangsdosis, andererseits überlebte keines der Tiere, was eher für eine noch niedrigere Restaktivität spricht. Das Maß des Abbaus kann somit auch mehr als 99% betragen haben.

V Weitere Reinigungsversuche und biochemische Charakterisierung der aktiven Fraktionen

Wie in Abschnitt IVa beschrieben, hatte die analytische Dünnschichtchromatographie gezeigt, daß die hochaktive Fraktion Do6/7 noch mehr als 10 Einzelkomponenten enthielt. Es wurde daher versucht, mit weiteren Reinigungsverfahren möglichst die noch vorhandenen inaktiven Komponenten von den aktiven abzutrennen. Hierzu wurden zwei Verfahren nebeneinander angewendet, bei denen auf Grund früherer Untersuchungen angenommen werden konnte, daß sie zu den gewünschten Ergebnissen führen könnten. Es waren dies:

a) eine zweite Gelpermeation über Biogel P2 mit einer sehr starken Änderung der Ionenstärke im Elutionspuffer
b) eine präparative Dünnschichtchromatographie unter Bedingungen, wie sie schon bei der analytischen Dünnschichtchromatographie angewendet worden waren, also auf mit Kieselgel beschichteten Platten mit Laufmittel Nr. 1

a) Gelpermeation mit Biogel P2 und 1 M Kochsalz im Puffer

Bei den Arbeiten an dem in Abschnitt III beschriebenen alternativen Trennungsgang hatte sich gezeigt, daß unterschiedliche Ionenstärken in den Elutionspuffern das Verhalten der in den Fraktionen enthaltenen Komponenten bei einer Gelpermeation stark verändern können. Die Fraktion Do6/7 wurde daher ein zweites Mal über eine Säule mit Biogel P2 geschickt, deren Elutionspuffer außer 0,01 M Ammoniumbicarbonat/Ammoniak pH 8,0 noch 1 M Kochsalz enthielt. Die Maße der Säule waren:

Säulenlänge:	95 cm
Säulendurchmesser:	0,8 cm
Säulenvolumen:	45,5 ml

Da kein Zusatz von Natriumazid oder einer anderen bakterizid oder fungizid wirkenden Substanz verwendet wurde, mußte im Kühlraum bei +4°C gearbeitet werden.
Ein Elutionsdiagramm der Trennung ist in Bild 23 dargestellt. Es wurde wie eingezeichnet in Fraktionen unterteilt. Diese erhielten die Bezeichnungen S1 - S5.

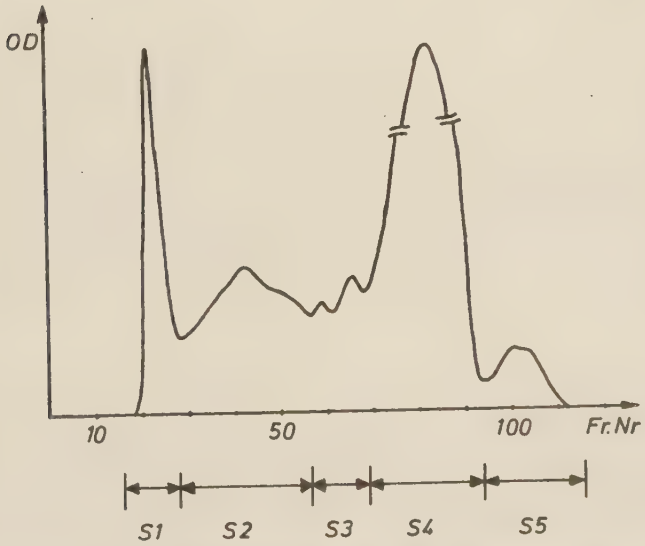


Bild 23: Elutionsdiagramm der zweiten Gelpermeation mit Biogel P2. Aufgetragen wurde die Fraktion Do6/7. Das Diagramm wurde bei 260 nm aufgenommen.

Wie aus Bild 23 ersichtlich ist, wurden nur drei Fraktionen so eluiert, daß klar abgegrenzte Absorptionsmaxima im Elutionsdiagramm zu erkennen waren. Diese waren die Fraktionen S1, S4 und S5. Die beiden übrigen Fraktionen S2 und S3 überschnitten sich dagegen stark.

Zur Abtrennung des Kochsalzes und des Ammoniumbicarbonats wurden die fünf Fraktionen über Dowex 50 WX 2 entsalzt. Anschließend wurden sie gefriergetrocknet. Es wurde zartgelbes, körniges Material erhalten.
Ein Test auf biologische Aktivität mit den Fraktionen der zweiten Biogel P2 Säule ergab, daß das aktive Material sich nicht auf eine oder wenigstens wenige Fraktionen aufgetrennt hatte. Alle fünf Fraktionen erwiesen sich als biologisch aktiv und alle waren dies auch etwa gleich stark. Das Ergebnis des Tests ist in den Tabellen 10 bis 12 dargestellt. Diese Tabellen zeigen die gleichartige Aktivität der Fraktionen recht deutlich.
Die Trennung von Do6/7 über Biogel P2 mit 1 m Kochsalz im Elutionspuffer hatte also nicht zu einer Ausbildung klar abgegrenzter aktiver Fraktionen geführt. Vielmehr war die Aktivität über den gesamten Elutionsbereich verschleppt worden.
Trotz dieses Befundes wurde auch eine biochemische Charakterisierung der Fraktionen vorgenommen. Die UV-Spektren zeigten bereits, daß die Fraktionen in ihrem Absorptionsverhalten gegen ultraviolettes Licht weitgehend gleich sind. Diese Spektren sind in Bild 24 wiedergegeben. Lediglich die Fraktion S4 zeigt zusätzlich noch starke Absorption bei 280 nm, was darauf schließen läßt, daß die freien Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin darin enthalten sind.
Eine weitere Bestätigung der mangelhaften Trennung dar Komponenten bei der Gelpermeation mit 1 m Kochsalz lieferte die analytische Dünnschichtchromatographie. Ein Chromatogramm mit dem Laufmittel Nr. 1 ist in Bild 25 wiedergegeben. Es zeigt, daß der hell fluoreszierende, früher schon mit O bezeichnete Fleck am Start, in allen Fraktionen enthalten ist. Er muß

Tabelle 10:

Tag Nr.	3	6	10	15	20	25	30	35	50	100	150
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	3/7/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	6/0/4	0/0/10	0/0/10	0/0/10
S1 4µg AS /Tier	0/10/0	5/5/0	8/2/0	9/1/0	8/2/0	7/3/0	6/3/1	2/3/5	0/3/7	0/3/7	0/3/7
S2 6µg AS /Tier	0/10/0	4/6/0	8/2/0	8/2/0	7/3/0	7/3/0	5/3/2	2/3/5	0/3/7	0/3/7	0/3/7
S3 3µg AS /Tier	0/10/0	1/9/0	7/3/0	7/3/0	8/2/0	8/2/0	6/2/2	3/2/5	0/2/8	0/2/8	0/2/8
S4 5µg AS /Tier	0/10/0	3/7/0	7/3/0	10/0/0	6/4/0	6/4/0	5/4/1	1/4/5	0/4/6	0/4/6	0/4/6
S5 2,5µg AS /Tier	0/10/0	4/6/0	5/5/0	0/10/0	8/2/0	8/2/0	5/2/3	1/2/7	0/2/8	0/2/8	0/2/8

Tabelle 11:

Tag Nr.	3	6	10	15	20	25	30	35	50	100	150
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	3/7/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	6/0/4	0/0/10	0/0/10	0/0/10
S1 400ng AS/Tier	0/10/0	3/7/0	6/4/0	9/1/0	8/2/0	8/2/0	7/3/0	4/3/3	2/3/5	0/3/7	0/3/7
S2 600ng AS/Tier	0/10/0	2/8/0	6/4/0	10/0/0	9/1/0	8/2/0	8/2/0	5/2/3	2/2/6	0/2/8	0/2/8
S3 900ng AS/Tier	0/10/0	3/7/0	6/4/0	9/1/0	9/1/0	8/2/0	7/2/1	4/2/4	1/2/7	0/2/8	0/2/8
S4 500 ng AS/Tier	0/10/0	2/8/0	7/3/0	10/0/0	8/2/0	7/3/0	7/3/0	3/3/4	1/3/5	0/3/7	0/3/7
S5 250 ng AS/Tier	0/10/0	0/10/0	2/8/0	4/6/0	9/1/0	9/1/0	9/1/0	8/1/1	4/1/5	1/1/8	0/1/9

Tabelle 12:

Tag Nr.	3	6	10	15	20	25	30	35	50	100	150
Kontrolle	0/10/0	0/10/0	3/7/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	6/0/4	0/0/10	0/0/10	0/0/10
S1 40ng AS/Tier	0/10/0	1/9/0	5/5/0	7/3/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	8/0/2	1/0/9	0/0/10	0/0/10
S2 60ng AS/Tier	0/10/0	0/10/0	5/5/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	7/0/3	0/0/10	0/0/10	0/0/10
S3 90ng AS/Tier	0/10/0	1/9/0	5/5/0	8/2/0	10/0/0	10/0/0	9/0/1	6/0/4	0/0/10	0/0/10	0/0/10
S4 50ng AS/Tier	0/10/0	0/10/0	4/6/0	6/4/0	9/1/0	9/1/0	9/1/0	7/1/2	2/1/7	0/1/9	0/1/9
S5 25ng AS/Tier	0/10/0	0/10/0	4/6/0	9/1/0	7/3/0	7/3/0	7/3/0	7/3/0	2/3/5	0/3/7	0/3/7

Tabellen 10 bis 12: Tabellen zum Test auf biologische Aktivität der Fraktionen der zweiten Biogel P2 Säule mit 1 M Kochsalz im Elutionspuffer. AS = Aminosäuren. Die Aminosäurenmasse wurde nachträglich bestimmt. Die Tiere einer Versuchsreihe (jeweils in einer Tabelle dargestellt) erhielten die selben Mengen an Einwaage. Diese betrug bei den Tieren der Tabelle 10 je 10 ug. Die Tiere der beiden anderen Tabelle erhielten zehn- bzw. hundertfach niedrigere Dosen.

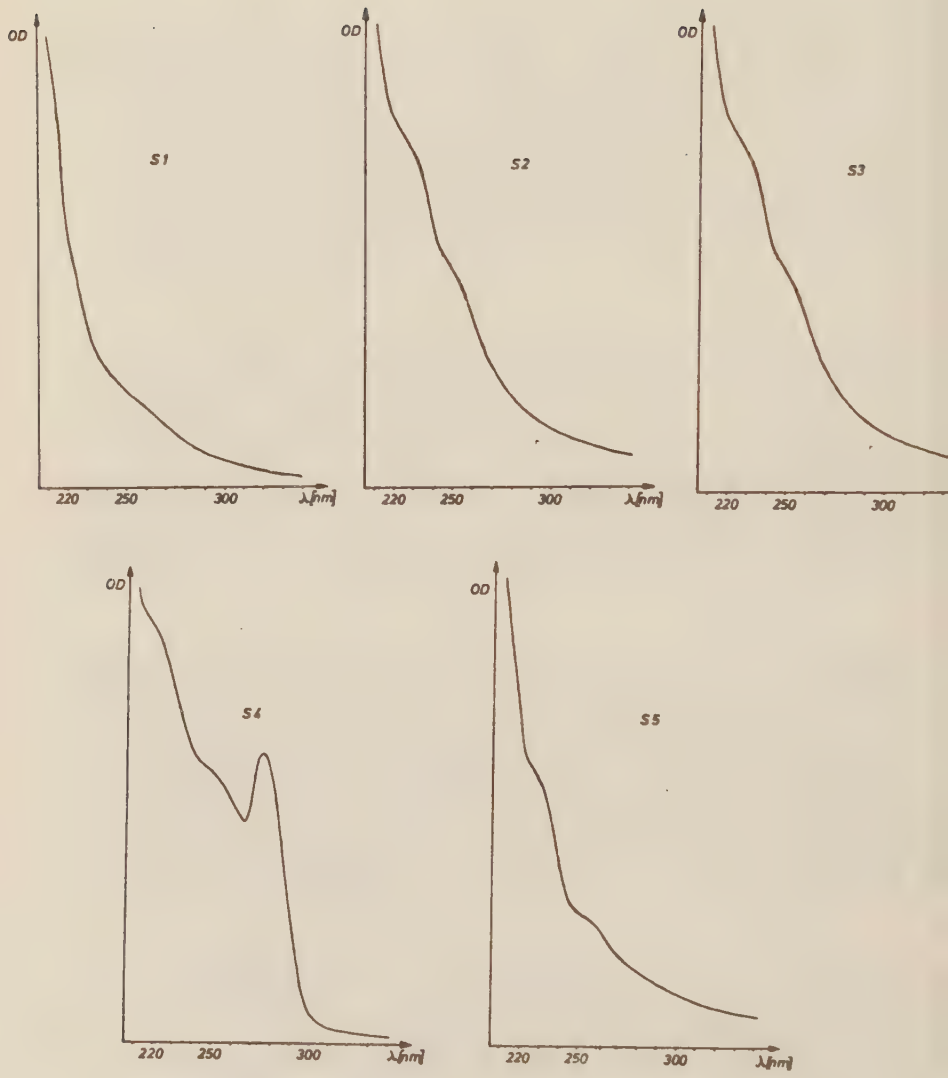


Bild 24: UV-Spektren der Fraktionen der zweiten Biogel P2 Säule mit 1 m Kochsalz im Elutionspuffer.

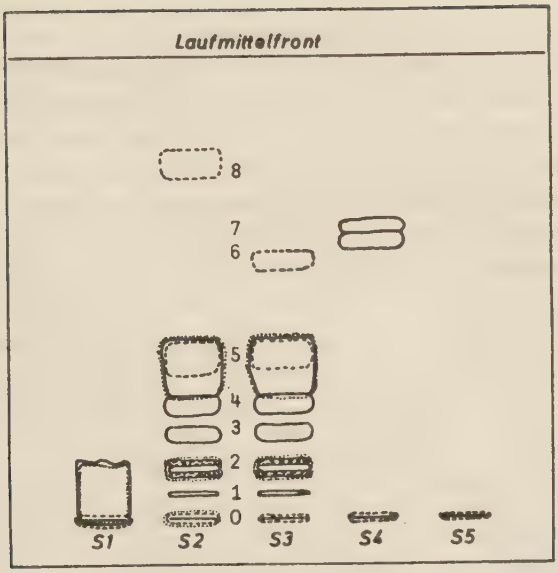


Bild 25: Analytisches Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen der zweiten Biogel P2 Säule mit 0,01 m Ammoniumacetat/Ammoniak im Elutionspuffer. ——— = Ninhydrinfärbung, - - - - - = UV-Fluoreszenz, ····· = Chlorox

mindestens eine der aktiven Komponenten beinhalten. Die Komponenten 3, 4 und 5 waren in den Fraktionen S2 und S3 ziemlich gleich stark vertreten. Die freien Aminosäuren sind, wie nach den UV-Spektren schon vermutet wurde, in der Fraktion S4 zu finden, soweit es sich um Tyrosin und Phenylalanin handelt. Die basischen freien Aminosäuren befinden sich in S2 und S3. Auch dies ist ein Zeichen für die mangelhafte Trennung der zweiten Gelpermeation.
Auch die Aminosäurenzusammensetzung der Fraktionen der zweiten Gelpermeation mit Kochsalz im Puffer bestätigte nur die ungenügende Trennfähigkeit des Systems. Es konnte in keiner der Fraktionen eine ein-

fache Aminosäurenzusammensetzung gefunden werden. Lediglich bei der Fraktion S4 waren nur wenige Aminosäuren vorhanden und diese auch in einander ähnlichen Mengenverhältnissen. Allerdings enthielt ja die Fraktion S4 auch die freien Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Die Aminosäurenkomposition der Fraktionen der zweiten Gelpermeation ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13:

	S1	S2	S3	S4	S5
Lysin	11,7	17,5	7,7	3,1	7,5
Histidin	6,3	16,9	4,0	3,2	8,9
Arginin	2,1	10,4	3,6	1,1	2,3
Asparaginsäure	12,0	4,0	6,7	3,6	7,4
Threonin	3,7	2,4	3,4	2,4	3,1
Serin	2,4	1,6	2,3	3,9	2,7
Glutaminsäure	8,4	2,9	12,1	4,0	8,2
Prolin	7,3	3,0	5,8	2,4	4,2
Glycin	9,5	7,1	14,0	29,4	28,2
Alanin	13,9	5,5	9,6	3,5	8,1
Cystein	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-
Valin	9,8	5,4	7,3	-,-	5,8
Methionin	-,-	0,2	-,-	-,-	-,-
Isoleucin	0,8	0,9	1,3	-,-	1,5
Leucin	7,9	6,5	10,0	0,4	6,5
Tyrosin	1,3	8,3	7,7	19,3	2,1
Phenylalanin	2,9	7,4	4,4	23,7	3,3

Tabelle der Aminosäurenzusammensetzungen der Fraktionen der zweiten Gelpermeation mit Biogel P2 und 1 m Kochsalz im Elutionspuffer. Die Zahlenwerte sind in Mol-% angegeben.

b) Präparative Dünnschichtchromatographie

Wie im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben, hatte sich bei der analytischen Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Nr. 1 gezeigt, daß dieses System in der Lage war, die Komponenten, die in der hochaktiven Fraktion Do6/7 vorhanden waren, klar voneinander zu trennen. Eine Ausnahme bildeten hierbei ja lediglich die freien Aminosäuren, die in zwei Gruppen dicht zusammen liefen, dabei aber von den übrigen Komponenten gut abgesetzt waren. Es wurde nun versucht, dieses System zur weiteren Reinigung der aktiven Komponenten präparativ zu nutzen.

Hierzu wurde aus einer möglichst konzentrierten Lösung von Do6/7 strichförmig über die gesamte Breite einer Kieselgelplatte aufgetragen. Dabei wurden durch wiederholtes Eintrocknen und Auftragen 100 µg/cm Auftragstrecke auf die Platte gebracht, was bedeutete, daß bei einer Auftragsbreite von 15 cm 1,5 mg auf einer Platte aufgetrennt werden konnten. Nach dem Entwickeln wurden die hell fluoreszierenden Banden mit Bleistift markiert, dann die mittleren 12 cm der Kieselgelplatte abgedeckt und die Ränder mit Ninhydrin-Sprühreagenz besprüht. Nach der Färbung konnten so die Banden im Mittelteil der Platte lokalisiert werden. Sie wurden entsprechend der analytischen Dünnschichtchromatographie mit DC-0 bis DC-8 bezeichnet. Die Banden wurden nun mit dem Kieselgel ausgekratzt und das dadurch erhaltene Pulver dreimal mit 1/10 M Ammoniak extrahiert. Da DC-4 und DC-5 sehr eng zusammen lagen wurden sie gemeinsam ausgekratzt und extraniert. Sie erhielten die Bezeichnung DC-4/5. Die Extrakte wurden gefriergetrocknet und ergaben weiße, körnige Pulver. Sie enthielten noch hohe Mengen an anorganischem Material, das aus den Dünnschichtplatten

stammte. Deshalb wurden sie über Dowex 50 WX 2 entsalzt und erneut gefriergetrocknet.
Da bereits bekannt war, daß DC-2 und DC-7 freie Aminosäuren waren, wurden diese beiden Fraktionen nicht in einem biologischen Test auf Aktivität überprüft. Dies geschah ebenso nicht mit der Fraktion DC-1, die ja als aktive Fraktion nicht in Frage kam (siehe Seite 47f). Mit den übrigen Fraktionen wurde ein Test auf biologische Aktivität durchgeführt. DC-6 und DC-8 wurden dabei vereinigt und als DC-6+8 bezeichnet.
Bei diesem Versuch wurden zwei Reihen angelegt. Jede dieser Reihen bestand aus fünf Testgruppen und einer Kontrollgruppe. Die STU-D17-Zellen einer Reihe stammten aus demselben Kulturgefäß. Die Tiere der ersten Reihe erhielten die Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie in einer Dosis von 500 ng pro Tier. Bei der zweiten Reihe wurden zehnfach niedrigere Dosen eingesetzt.
Die Ergebnisse der beiden Testreihen sind in den Bildern 26 und 27, sowie in den Tabellen 14 und 15 dargestellt.
Wie aus Bild 26 und Tabelle 14 hervorgeht, waren die Tumore der Kontrolltiere, die zu der Reihe gehörten, die die hohen Dosen erhalten hatten, zwischen dem 8. und 26. Tag feststellbar geworden. Die Phase des progressiven Wachstums wurde um Tag 35 herum erreicht. Genau das selbe Verhalten hatten die Tumore der Gruppe gezeigt, die DC-6+8 erhalten hatte.
Sehr deutlich war die biologische Aktivität der Fraktion DC-4/5 zu sehen. Nur 7 der 10 Tiere, die mit diesem Material behandelt worden waren, entwickelten überhaupt feststellbare Tumore und diese konnten auch erst deutlich später entdeckt werden als die der Kontrolltiere. Die Fraktion hatte also in der Konzentration von 500 ng pro Tier gute Verzögerungs und Schutzwirkung.

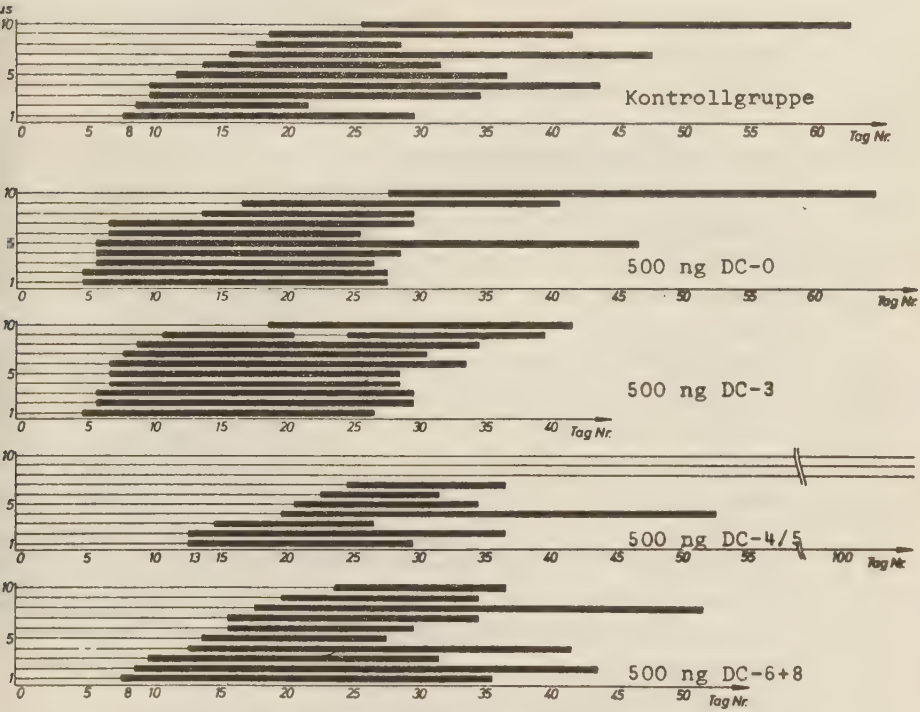


Bild 26: Test auf biologische Aktivität mit den Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie.

Tabelle 14:

Tag Nr.	5	8	11	15	20	25	30	35	50	60	100
Kontrolle	0/10/0	1/9/0	4/6/0	6/4/0	9/1/0	8/1/1	8/0/2	5/0/5	1/0/9	1/0/9	0/0/10
DC-0	2/8/0	7/3/0	7/3/0	8/2/0	9/1/0	9/1/0	3/0/7	3/0/7	1/0/9	1/0/9	0/0/10
DC-3	1/9/0	7/3/0	9/1/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	5/0/5	2/0/8	0/0/10	0/0/10	0/0/10
DC-4/5	0/10/0	0/10/0	0/10/0	3/7/0	4/6/0	7/3/0	5/3/2	3/3/4	1/3/6	0/3/7	0/3/7
DC-6+8	0/10/0	1/9/0	3/7/0	5/5/0	9/1/0	0/10/0	8/0/2	5/0/5	1/0/9	0/0/10	0/0/10

Tabelle zum Test auf biologische Aktivität mit den Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie. Die eingesetzten Dosen waren je Fraktion und Tier 500 ng. Die Zahlen bedeuten: Tiere mit Tumor/Tiere ohne Tumor/ getötete Tiere.

Ganz anders zeigten die Fraktionen DC-0 und DC-3 ihre biologische Aktivität. Die Tumore der entsprechenden Tiere wuchsen schneller als die der Kontrolltiere. Diese beiden Fraktionen hatten also ihre Fähigkeit zur Beschleunigung des Tumorwachstums gezeigt. Eine Auftrennung in beschleunigende und schützende Komponenten hätte aus diesem Befund zwar abgeleitet werden können, aber da bekannt war, daß die beobachtbaren Effekte stets sehr stark abhängig von der eingesetzten Dosis einer aktiven Fraktion waren, mußte erst der Vergleich mit den Ergebnissen der Reihe mit niederen Dosen herangezogen werden, um eine solche Aussage zu machen.

Wie sehr die eben erwähnte Dosisabhängigkeit der Art der biologischen Aktivität bei allen Fraktionen die Ergebnisse der Aktivitätsteste beeinflußt, zeigt sich bei Vergleich der Resultate, die mit den hohen Dosen erzielt worden waren, mit denen der durch niedere Dosen entstandenen. Diese, mit den zehnfach niedrigeren Mengen erhaltenen Ergebnisse sind in Bild 27 und Tabelle 15 aufgeführt.

Die Kontrolltumore wuchsen hier sehr schnell, so daß eine Beschleunigung des Tumorwachstums nur schwer gemessen werden konnte. Trotzdem war noch zu sehen, daß die bei hoher Dosis bremsend wirkende Fraktion DC-4/5 bei niedriger Dosis ein schnelleres Wachstum der Tumore bewirkt hatte. Der Schutzeffekt der Fraktion war dagegen noch gut zu sehen, denn zwei Tiere überlebten den Versuch.

DC-3 hatte bei der niederen Dosis nur noch wenig Aktivität gezeigt, so daß angenommen werden muß, daß diese Fraktion nur vergleichsweise schwach aktiv ist. Wieder inaktiv war die Fraktion DC-6+8.

Am stärksten war bei der niederen Dosis die biologische Aktivität der Fraktion DC-0. Das Wachstum der

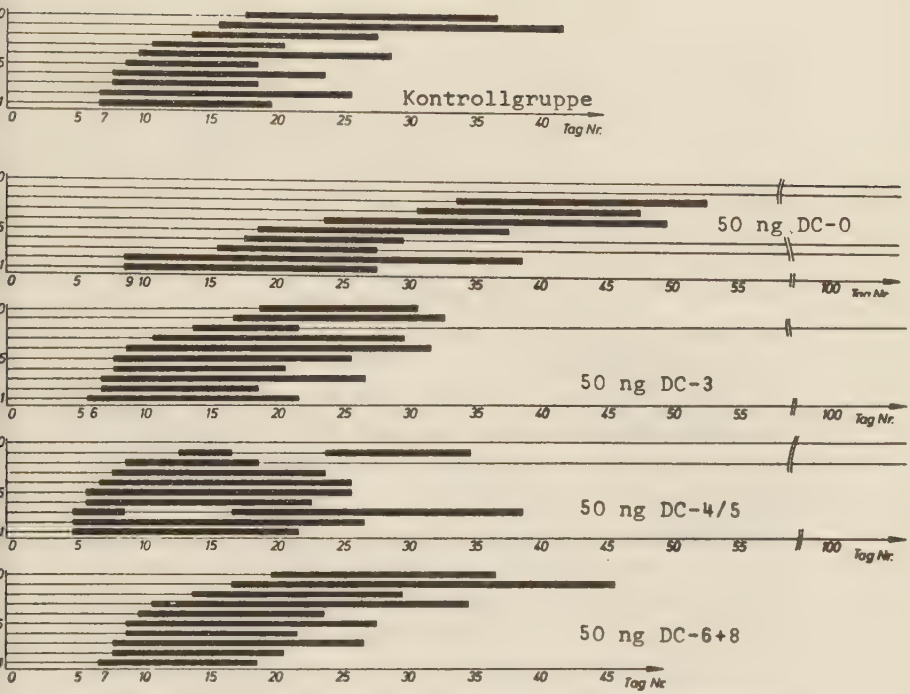


Bild 27: Test auf biologische Aktivität mit den Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie mit niederen Dosen.

Tabelle 15:

Tag Nr.	5	7	10	15	20	25	30	35	40	50	100
Kontrolle	0/10/0	2/8/0	6/4/0	8/2/0	7/0/3	5/0/5	2/0/8	2/0/8	1/0/9	0/0/10	0/0/10
DC-0	0/10/0	0/10/0	2/8/0	2/8/0	5/5/0	6/4/0	4/5/1	5/4/1	3/4/3	1/4/6	0/4/7
DC-3	0/10/0	3/7/0	6/4/0	8/2/0	9/0/1	6/1/3	3/1/6	0/1/9	0/1/9	0/1/9	0/1/9
DC-4/5	3/7/0	6/4/0	7/3/0	8/2/0	7/3/0	5/2/3	2/2/6	1/2/7	0/2/8	0/2/8	0/2/8
DC-6+8	0/10/0	1/9/0	6/4/0	8/2/0	9/0/1	6/0/4	3/0/7	2/0/8	1/0/9	0/0/10	0/0/10

Tabelle zum Test auf biologische Aktivität mit den Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie. Alle Tiere erhielten 50 ng der jeweiligen Fraktion. Zum Zahlencode siehe die Tabelle 14.

entsprechenden Tumore verlief stark gebremst gegenüber dem der Kontrolltumore. Auch der Übertritt in die progressive Wachstumsphase erfolgte später, erkennbar daran, daß in Bild 27 die dicken Balken im Diagramm der entsprechenden Versuchsgruppe länger sind. Zwei der Tiere stießen die transplantierten Tumorzellen so schnell ab, daß bei ihnen überhaupt keine Geschwulste zu entdecken waren und zwei weitere Mäuse entwickelten zwar feststellbare Tumore, konnten diese aber wieder abbauen.

Zur biochemischen Charakterisierung wurden nun einmal UV-Spektren und zum anderen analytische Dünnschichtchromatogramme hergestellt. Die Spektren der im biologischen Versuch eingesetzten Fraktionen sind in Bild 28 dargestellt. In Bild 29 sind die Spektren der aktiven Vorstufen und das Spektrum von DC-0, das ja am stärksten biologisch aktiv war, zusammen abgebildet. Es fällt auf, daß die aktiven Fraktionen DC-0, DC-3 und DC-4/5 die charakteristischen Absorptionsmaxima bei 220 nm und bei 250 bis 260 nm aufweisen. DC-6+8, das inaktiv ist, zeigt dagegen ein gänzlich anderes Bild mit nur der Andeutung einer Absorption bei 230 nm und einem äußerst hohen Maximum bei 260 bis 270 nm.

Ein überraschendes Ergebnis zeigte sich bei der analytischen Dünnschichtchromatographie. Es hätte erwartet werden müssen, daß jede der ausgekratzten Fraktionen bei einem erneuten Lauf im selben System nur wieder einen einzigen definierten Fleck erzeugen sollte. Wie Bild 30 zeigt, war dies jedoch nur bei den Fraktionen DC-1, DC-2, DC-6 DC-7 und DC-8 der Fall. Die Fraktion DC-4/5 ergab nur noch den bei der analytischen Dünnschichtchromatographie von Do6/7 mit 5 bezeichneten Fleck. Aus Fraktion DC-3 entstand ebenfalls der Fleck 5 und ganz schwach der Fleck 3. Am

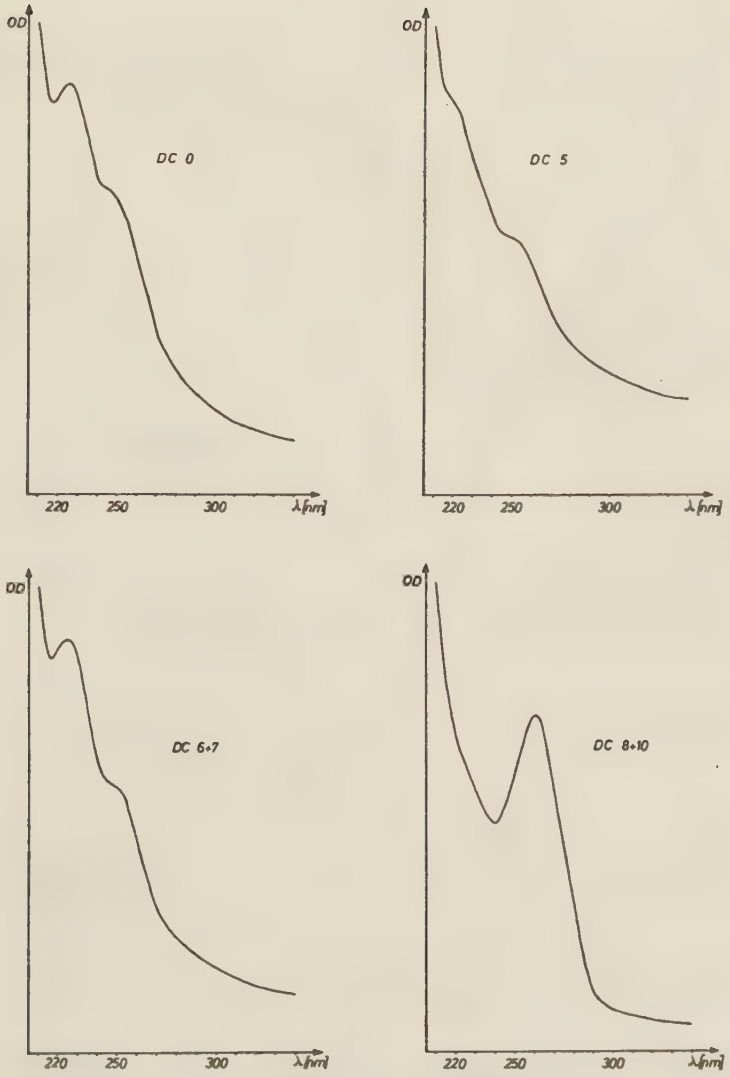


Bild 28: UV-Spektren der im biologischen Test eingesetzten Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie.

Bild 29: UV-Spektren der biologisch aktiven Fraktionen, wie sie im Verlauf der Trennung erhalten werden. Die Kurve für die Fraktion P3/4 wurde überhöht, um sie auf den selben Aminosäurengehalt zu beziehen wie die übrigen Fraktionen.

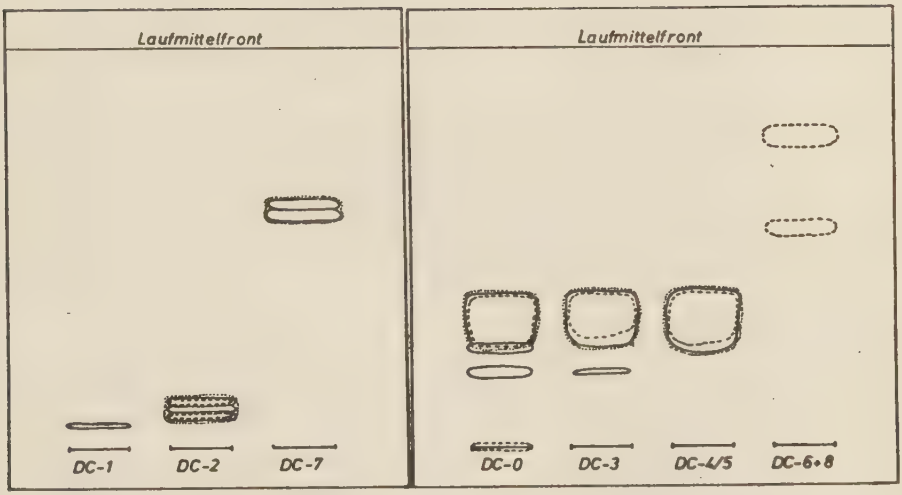


Bild 30: Analytisches Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie. ——— = Ninhydrinfärbung, ------ = UV-Fluoreszenz, ····· = Chlorox

auffälligsten war das Fleckenmuster der Fraktion DC-0. Bei ihr blieb der Fleck 0 erhalten, und es entstanden zusätzlich die Flecken 3, 4 und 5.
Da beim Auskratzen und der Extraktion der Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie peinlichst darauf geachtet worden war, daß keine Verunreinigung der Fraktionen miteinander vorkommen konnte, mußte das Ergebnis der analytischen Dünnschichtchromatographie mit dem Verhalten der Komponenten selbst erklärt werden.Diese Erklärung mußte darin liegen, daß die ursprüngliche und unveränderte aktive Komponente in DC-0 enthalten war. DC-3, DC-4 und DC-5 waren Abbauprodukte, wobei DC-5 das Endprodukt dieses sicher nur partiellen Abbaus darstellte. Die angewendeten Bedingungen bei der Präparation der Fraktionen mußten dazu

geführt haben, daß DC-4 vollständig, DC-3 größtenteils und DC-0 teilweise in DC-5 verwandelt worden waren. Aus DC-0 war dabei auch noch etwas DC-3 und DC-4 entstanden.

Als weitere Charakterisierungsmethode wurde noch die Aminosäurenanalyse herangezogen. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, das Übergehen der Fraktionen ineinander zu bestätigen. Ein partieller Abbau einer Komponente sollte dazu führen, daß das Folgeprodukt

Tabelle 16:

	DC-0	DC-3	DC-4/5
Lysin	9,4	8,8	11,3
Histidin	8,9	8,5	8,0
Arginin	2,9	-,-	-,-
Asparaginsäure	7,5	7,2	6,5
Threonin	2,1	2,5	7,3
Serin	8,3	12,4	10,4
Glutaminsäure	3,9	6,2	4,9
Prolin	2,3	3.4	7,5
Glycin	37,8	47,9	28,9
Alanin	5,8	3,1	14,9
Cystein	1,9	-,-	-,-
Valin	2,1	-,-	-,-
Methionin	-,-	-,-	-,-
Isoleucin	1,5	-,-	-,-
Leucin	2,3	-,-	-,-
Tyrosin	1,0	-,-	-,-
Phenylalanin	2,3	-,-	-,-

Tabelle der Aminosäurenzusammensetzungen der Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie. Wiedergegeben sind nur die Zusammensetzungen der biologisch aktiven Fraktionen DC-0, DC-3 und DC-4/5.

weitgehend die selbe Aminosäurenzusammensetzung hatte, vorausgesetzt der Abbau erfolgte am Peptidteil. Fand er am Nucleinsäureanteil statt, so sollte die Aminosäurenzusammensetzung sogar identisch sein, bis auf den Gehalt an Glycin und Harnstoff, die ja auch aus den Nucleotiden stammen konnten.
In Tabelle 16 ist das Ergebnis der Aminosäurenanalysen zusammengestellt. Auf die Wiedergabe der Aminosäurenzusammensetzungen der Fraktionen DC-1, DC-2, DC-6, DC-7 und DC-8 wurde verzichtet, da sie entweder nur aus freien Aminosäuren bestanden oder nicht zu den biologisch aktiven Komponenten gehörten.
Aus Tabelle 16 geht hervor, daß tatsächlich die aktiven Fraktionen der präparativen Dünnschichtchromatographie aus den selben, in ihrer Zahl begrenzten Aminosäuren bestanden. Auch die Verhältnisse der Aminosäuren untereinander gleichen sich. Eine Ausnahme bildet dabei allerdings DC-0, das noch merkliche Mengen von Aminosäuren enthält, die in DC-3 und in DC-4/5 fehlen. Offenbar enthält diese, am Start der Dünnschichtchromatogramme verharrende Fraktion, noch Verunreinigungen anderer Stoffe, die ebenfalls nicht mit dem Laufmittel wandern können.

C) Diskussion

Aufgabe dieser Arbeit war es, eine biologisch aktive Fraktion aus Kalbsthymus so weit als möglich anzureichern und zu reinigen. Die biologische Aktivität dieser dialysierbaren Fraktion war bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (28) untersucht und dahingehend spezifiziert worden, daß Versuchstiere nach einer Vorbehandlung mit der Fraktion eine verstärkte Abwehr gegenüber Tumortransplantaten aufweisen können. Damals war gefunden worden, daß ein Vorbehandlungszeitraum beginnend mit dem fünften Tag vor der Tumortransplantation und endend am dritten Tag nach ihr eine optimale Deutlichkeit der beobachtbaren Effekte ergab. Weiter war in dieser Arbeit gesichert worden, daß es sich bei der niedermolekularen Komponente nicht um einen der bereits länger bekannten und von anderen Autoren beschriebenen höhermolekularen Thymusfaktoren (19,21) handelte.
Noch frühere Arbeiten an dialysierbaren biologisch aktiven Fraktionen aus Thymushomogenaten hatten gezeigt, daß der Faktor sowohl die humorale (26) wie auch die zelluläre (27) Immunantwort bei thymektomierten Mäusen zu restaurieren in der Lage war. Es mußte sich bei der biologisch aktiven Komponente um eine Effektorkomponente für das Immunsystem handeln. Diese Komponente sollte nun in der vorliegenden Arbeit möglichst weitgehend gereinigt werden und sie sollte hinsichtlich ihrer biologischen und biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden.
Eine wichtige Voraussetzung für die Anreicherung der aktiven Komponente der Fraktion war ein Testsystem, das einerseits möglichst sehr sensitiv die biologische Aktivität nachzuweisen gestattete, das andererseits aber auch in der Lage war, diese Aktivität zu

charakterisieren und das eine Interpretation der gefundenen Ergebnisse erlaubte. Das in dieser Arbeit verwendete System erfüllte alle diese Bedingungen recht gut. Die nachweisbaren Mengen an aktiven Fraktionen erreichten den Nanogrammbereich, bezogen auf die Einwaage an trockener Substanz. Bezogen auf die Masse der in den getesteten Fraktionen enthaltenen Aminosäuren, die, wie auf Seite 13 erläutert, ein wesentlich besseres Maß für den Gehalt an aktivem Material einer Fraktion war, lagen die nachweisbaren Mengen sogar an der unteren Grenze des Nanogrammbereichs.

Außer der hohen Sensitivität hatte das Testsystem noch den Vorteil, daß es recht deutlich verschiedene Arten von biologischer Aktivität unterschied. Es konnte differenzieren zwischen einer Wirkung in Form einer Beschleunigung von Tumorwachstum und verschiedenen Schutzwirkungen gegen dieses Wachstum. Gerade diese Unterscheidungsmöglichkeiten waren auch die Grundlage für eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse. Sie dienten zur Charakterisierung der aktiven Fraktionen in biologischer Hinsicht.

Schließlich war das Testsystem ein in vivo System und erlaubte somit den Bezug zur Tumorpathologie; das bedeutet, daß aus ihm Rückschlüsse gezogen werden können auf das vermutliche Verhalten der biologisch aktiven Fraktionen aus dem Thymus bei einer möglichen späteren Anwendung gegen menschliche Tumore.

Die biologische Charakterisierung der aktiven Komponente konnte bereits in einem sehr frühen Stadium der Anreicherung beginnen. Schon relativ roh gereinigte Fraktionen zeigten im biologischen Test das typische Verhalten, das auch mit hoch angereicherten Fraktionen immer wieder bestätigt wurde. Das Wachstumsverhalten von transplantierten STU-D17-Tumoren auf

STU-Mäusen wird stark beeinflußt. Dabei können, von ein und derselben Fraktion induziert, recht verschiedene Phänomene beobachtet werden. Ganz auffällig ist die Fähigkeit der aktiven Komponente die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore stark zu beschleunigen, teilweise bis auf den doppelten bis dreifachen Wert der Geschwindigkeit, die von Kontrolltumoren gezeigt wird. Ebenfalls recht auffällig ist die unter dem Einfluß der angereicherten Komponente auftretende Fähigkeit der Mäuse ihre Tumore abzubauen, teilweise in einem so frühen Stadium, daß sie gar nicht erst äußerlich nachweisbar werden, teilweise aber auch erst nachdem sie schon eine nachweisbare Größe erreicht haben. Eine Vorstufe zu einer Regression könnte dabei die Verlangsamung des Wachstums der Tumore sein.

Diese verschiedenartigen, jedoch von vermutlich nur einer einzigen aktiven Komponente (hierzu näheres siehe Seite 57) ausgelösten Effekte, können nur richtig gedeutet werden, seit bekannt ist, daß sie sehr stark abhängig von der eingesetzten Dosis sind. Bei dieser Dosisabhängigkeit und der dazugehörigen Interpretation können drei verschiedene Fälle unterschieden werden.

Bei niederer Dosierung des aktiven Materials, wenig über der Dosis, die keine beobachtbaren Effekte mehr auslöst, zeigen die behandelten Tiere zunächst die Fähigkeit das Wachstum ihrer transplantierten Tumore zu verlangsamen und in einigen Fällen diese Geschwulste erfolgreich abzubauen. Da angenommen werden muß, daß der Einfluß der aktiven Komponente über das Immunsystem erfolgt, bedeutet die Schutzwirkung niederer Dosen, daß durch sie die zelluläre Immunantwort auf die Tumore stimuliert wird. Wie in der Einleitung schon erläutert, sind ja gerade die zellulären Kompo-

nenten des Immunsystems diejenigen, die befähigt sind, erfolgreich gegen Tumore vorzugehen.
Werden den Versuchstieren wenig höhere Dosen als die zur Schutzwirkung günstigen verabreicht, so tritt bevorzugt eine Beschleunigung des Wachstums der Tumore auf, oft nur bei einem Teil der Versuchstiere, und dieser ist überlagert von einem immer noch vorhandenen Schutz. Meist sind in solchen Versuchsgruppen 10 bis 30% der Tiere befähigt zu einer Regression ihres Tumors. Das Phänomen der Beschleunigung des Tumorwachstums muß auf die von solchen Dosen induzierte Ausschüttung von humoralen Antikörpern zurückzuführen sein. Es ist ja bekannt, daß im Serum zirkulierende Antikörper als sogenannte "enhancing antibodies" das Wachstum von Tumoren begünstigen. Sie sind sogar unter anderem dafür verantwortlich, daß das Immunsystem der befallenen Individuen letztlich blockiert wird und damit unfähig den Tumor erfolgreich zu bekämpfen oder auch nur zu hemmen (29). Auch bei den mit wenig überhöhten Dosen behandelten Tieren muß ein solches Auftreten von "enhancing antibodies" zu der beschriebenen Wachstumsbeschleunigung bei den transplantierten Tumoren führen.
Erhalten die Versuchstiere noch höhere Dosen an aktivem Material, so tritt kaum noch eine merkliche Beeinflussung der Geschwindigkeit des Tumorwachstums auf. Überhaupt unterscheiden sich die Diagramme von Versuchsgruppen mit hohen Dosen kaum von denen der Kontrollgruppen. Allerdings tritt jetzt wieder ein stärkerer Schutzeffekt auf, der immer an vereinzelten Tumorregressionen zu erkennen ist. Dies kann nur damit erklärt werden, daß solche hohen Dosen bereits die Bildung cytotoxischer Antikörper induzieren, die dann ihrerseits verantwortlich für die anders geartete Schutzwirkung sind.

Aus all dem geht hervor, daß die Einwirkung der aktiven Komponente allgemeiner und nicht spezifischer Art ist. Das Immunsystem von behandelten Tieren wird ganz allgemein stimuliert, ohne daß zunächst ein Kontakt mit einem Antigen vonnöten ist. Dabei spielen offenbar gewisse Schwellenwerte eine Rolle. Die zelluläre Immunantwort wird schon mit niedrigen Dosen stimuliert, die noch nicht für die Bildung hoher Mengen von Antikörpern ausreichen. Humorale Antikörper werden erst oberhalb einer kritischen Grenze verstärkt ausgeschüttet. Die höchsten Dosen erfordert die Bildung cytotoxischer Antikörper. Die Zielrichtung der Immunantwort, die durch die Behandlung mit der aktiven Fraktion ausgelöst wird, dürfte zunächst noch unbestimmt sein. Erst der Kontakt mit dem entsprechenden Antigen, im biologischen Testsystem sind dies die Oberflächenantigene der Tumorzellen, lenkt die Abwehrleistung des bis dahin nur in Alarmbereitschaft versetzten Immunsystems in die richtigen Bahnen. Nur so ist zu erklären, daß die bei den Arbeiten an den biologischen Eigenschaften der aktiven Komponente beobachteten starken Effekte, durch eine Vorausbehandlung mit diesem aktiven Material ausgelöst wurden.

Sollen nun die Ergebnisse dieser Arbeit verallgemeinert und auf das Verhalten menschlicher Tumore angewendet werden, so ist vor allem die starke Mengenabhängigkeit der erzielbaren Effekte von Bedeutung. Wenn eine bestimmte Dosis zu einem oft beträchtlichen Schutz, eine etwas höhere aber zu einer ebenso oft starken Beschleunigung des Wachstums eines Tumors führt, so läßt sich der Faktor nur nach sehr ausführlichen Untersuchungen in der Bekämpfung von Krebserkrankungen einsetzen. Zudem sind mit der aktiven Kom-

ponente bis jetzt nur Tumore von maximal 4 bis 5 mm Durchmesser und auch fast ausschließlich vorbeugend erfolgreich bekämpft worden. Diese kritische Tumorgröße von nicht einmal einem halben cm reicht aber bei menschlichen Tumoren noch lange nicht aus, um sie überhaupt zu diagnostizieren. Eine erfolgreiche Therapie scheint damit zumindest vorläufig ebenfalls fraglich. Lediglich in der Bekämpfung von Rezidiven, unmittelbar nach chirurgischer Entfernung eines Primärtumors, könnte eine Behandlung mit dem hier untersuchten Thymusfaktor erfolgversprechend sein.
Ob der aus dem Thymus stammende Faktor auch durch eine Nachbehandlung zu Tumorregressionen führen kann, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausschließen, aber auch noch nicht sicher bejahen. Es wurden zwar schon Vorversuche in dieser Richtung unternommen, die darauf hindeuten, daß auch eine nach der Tumortransplantation durchgeführte Behandlung noch zu einer Schutzwirkung führen könnte, ebenfalls wieder bei kleinen Tumoren. Eine zuverlässige Aussage hierüber kann allerdings noch nicht gemacht werden.
Die biochemischen Charakteristika der biologisch aktiven Komponente waren vergleichsweise schwierig zu erfassen. Es wird natürlich erst dann möglich sein, die chemische Struktur der aktiven Komponente aus Kalbsthymusdialysat zu bestimmen, wenn es gelungen ist, sie in größeren Mengen als reine Substanz zu erhalten. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Trennungsganges gelang es auf diesem Weg bereits ein gutes Stück voranzukommen. Die Fraktion Do6/7 ist schon sehr hoch angereichert an der aktiven Komponente (8000-fach). Mit ihr gelang es ja auch die enzymatischen Abbauversuche durchzuführen. Diese zeigten,

daß das aktive Molekül einen Peptid- und einen Nucleinsäureanteil besitzt. Der Peptidteil enthält nur wenige verschiedene Aminosäuren. Es sind dies: Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Threonin, Prolin, Glycin und Alanin, sowie die basischen Aminosäuren Lysin und Histidin. Asparaginsäure und Glutaminsäure könnten als Säureamide vorliegen, da der Faktor ja stark basischen Charakter zeigt.

Das Molekulargewicht der aktiven Komponente kann nur schwer bestimmt werden, solange noch keine Strukturbestimmung gelungen ist. Ihrem Verhalten auf Biogel P2 nach müßte die aktive Komponente ein relativ niederes Molekulargewicht in der Größenordnung von 1000 Dalton haben. Auch die Fähigkeit Ultrafiltrationsmembranen mit einer Durchlaßgrenze für Peptide von 2000 Dalton zu passieren zeigt in diese Richtung. Trotzdem sind diese Werte sicher sehr unzuverlässig, denn sie würden nur dann mit größerer Sicherheit dem wirklichen Wert entsprechen, wenn der Faktor ein reines Peptid wäre. Da er jedoch auch ein Ribonucleinsäureende besitzt, kann nur mit großer Vorsicht gesagt werden, daß sein Molekulargewicht bei ca. 10 bis 12 Aminosäuren mit einem mittleren Molekulargewichtsanteil von 110 bis 120 Dalton und einer Nucleinsäurekette von 5 Nucleotiden mit insgesamt etwa 1500 Dalton ungefähr 3000 Dalton betragen dürfte.

Trennungsversuche zur noch weitergehenden Anreicherung mit hoher Ionenstärke bei Gelpermeationen und organischen Lösungsmitteln bei einer Dünnschichtchromatographie zeigten, daß die aktive Fraktion aus mehreren aktiven Komponenten besteht, die möglicherweise ineinander überführbar sind. Zur endgültigen biochemischen Charakterisierung müssen aber noch weitere Methoden entwickelt werden. Der gegenwärtige Anreicherungsfaktor (8000 bezogen auf Aminosäurengehalt)

erlaubt jedoch weitere gezielte Untersuchungen über den biologischen Regelmechanismus für den beobachteten Schutz gegen Tumorwachstum und die Beschleunigung desselben.

D) Zusammenfassung

Kalbsthymushomogenate enthalten eine dialysierbare Fraktion, die in Versuchstieren das Wachstum von Tumoren beeinflussen kann. Die aktive Fraktion wurde durch Molekularsiebverfahren und durch Ionenaustauscherchromatographie weiter angereichert, wobei ein Anreicherungsfaktor von 8000 hinsichtlich der biologischen Aktivität erreicht werden konnte.
Eine Vorbehandlung von Versuchsmäusen mit niederen Dosen der hochgereinigten Fraktion führte zu einer partiellen Unterdrückung des Tumorwachstums. Mittlere Dosen führten in einem kritischen Bereich zu einer partiellen Wachstumsförderung von Tumortransplantaten. Dagegen zeichneten sich hohe Dosen wieder durch eine partielle Unterdrückung des Tumorwachstums aus.
Die Kriterien der Ionenaustauscherchromatographie zeigten, daß die aktive Fraktion erst ab pH 9,5 von einem Kationenaustauscher eluiert werden kann, das heißt, daß sie basischen Charakter haben muß. Diese hochgereinigte Fraktion enthielt 30% Aminosäurenanteil mit den Aminosäuren Lysin (1-2), Histidin (1), Asparaginsäure (1), Threonin (1), Serin (2), Glutaminsäure (1), Prolin (1), Glycin (unbestimmbare Zahl, da Glycin auch aus Nucleinsäureabbau stammt) und Alanin (1-2). Die UV-Spektren der aktiven Fraktionen weisen jedoch auch eindeutig auf die Anwesenheit von Nucleotiden hin. Dies wird durch die Fluoreszenz der biologisch aktiven Flecken in der Dünnschichtchromatographie bestätigt. Die biologische Aktivität wird weitgehendst zerstört durch die Behandlung mit Pronase und Chymotrypsin, sowie durch Ribonuclease A und Ribonuclease T_1, nicht jedoch durch Desoxyribonuclease. Das heißt, daß die aktive Komponente sensi-

tive Peptid- und Ribonucleotidbindungen besitzen muß. Über den Reinheitsgrad der aktiven Fraktion kann noch keine genaue Aussage gemacht werden, da bei verschiedenen weiteren Reinigungsverfahren mehrere aktive Komponenten erhalten wurden, die in ihren biochemischen Kriterien (Aminosäurenzusammensetzung und UV-Spektren) sich weitgehend ähnlich waren und sich auch in ihrer spezifischen Aktivität nicht signifikant unterschieden. Die bisher bestgereinigte Fraktion war noch in Nanogrammengen pro Maus gut wirksam.

E) Material, Geräte und Methoden

I Material

Säulenmaterial:
Biogel P2, P4 und P6, Biorad Laboratories, Richmond, Cal. USA
Dowex 50 WX 2, Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dünnschichtplatten:
DC-Fertigplatten Kieselgel 60, E.Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche:
Union Carbide Corporation, Chicago, Ill. USA
Ultrafiltrationsmembranen:
Diaflo Ultrafiltrationsmembranen UM2, Amicon-Corporation, Lexington, Mass. USA
Thymus:
Kalbsthymus wurde von der Metzgerei F.Holz 7907 Langenau bezogen. Das Material wurde sofort nach der Entnahme aus den Kälbern tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.
Tiere:
Hoch ingezüchtete STU-Mäuse (35) aus den Generationen 92 bis 96 aus eigener Zucht
Enzyme:
Chymotrypsin von E.Merck, Darmstadt
RNAse A, RNAse T_1 und Pronase von Serva Feinbiochemica, Heidelberg
DNAse I von Boehringer, Mannheim
Chemikalien:
Alle verwendeten Chemikalien waren von den Firmen E.Merck, Darmstadt oder Serva Feinbiochemica, Heidelberg. Sie wurden in der reinsten Lieferform bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

II Geräte

Spektralphotometer:
Zeiss PS Q III, Carl Zeiss, Oberkochen

Fraktionssammler:
Serva ST mit Signalgeber STZ, Serva, Heidelberg
LKB Type 3402 B, LKB, Bromma, Schweden
LKB 7000 Ultrorac, LKB, Bromma, Schweden
UV-Durchflußphotometer:
LKB Uvicord I und II, LKB, Bromma, Schweden
Zentrifugen:
Stock Kühlzentrifuge, W.Stock, Marburg
Sorvall RC-3, Sorvall Inc., Norwalk, Conn. USA
Beckmann Spinco L2 50B, Beckmann Instruments GmBH, München
Christ Zentrifuge UJ I KS, Heraeus-Christ, Osterode
pH-Meter:
Radiometer Modell pH 26, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Homogenisator:
Sorvall Omni-Mixer, Sorvall Inc., Norwalk, Conn. USA
Ultrafiltrationskammer:
Amicon Modell 402, Amicon GmBH, Witten (Ruhr)
Gefriertrockner:
Es wurde ein von der Werkstatt des Max-Planck-Instituts für Virusforschung Tübingen hergestellter Lyophilisator verwendet.
Aminosäurenanalysator:
Beckmann Spinco Modell 120, Beckmann Instruments GmBH, München

III Methoden

1.) Aminosäurenanalysen

5 bis 50 mg einer Probe (die Menge wurde entsprechend der zu erwartenden Aminosäurenmasse eingewogen) wurden in 0,5 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in ein Bombenrohr aus Glas überführt und 0,5 ml rauchende Salzsäure zugesetzt. Unter sorgfältigem Begasen mit Stickstoff wurde das Rohr zugeschmolzen.

Anschließend wurde 24 Stunden bei 110°C erhitzt. Nach dieser sauren Hydrolyse wurde das Rohr geöffnet und der Inhalt quantitativ in eine kleine Kristallisierschale überführt. Diese kam über Nacht in einen Exsikkator, um unter Vakuum und über NaOH zur Trockne einzudampfen. Der feste Rückstand wurde in Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und auf die Austauschersäule eines automatischen Aminosäurenanalysators aufgetragen. Die erhaltenen Chromatogramme des Analysators wurden mit Hilfe eines Aminosäurenstandards ausgewertet. Es wurden die in der Probe enthaltenen Aminosäurenmengen in uMol erhalten.

2.) Enzymbehandlung der biologisch aktiven Fraktion Do6/7 (37)

a) Behandlung mit Chymotrypsin

Die Behandlung wurde in 0,08 M Tris-HCl-Puffer pH 7,8 durchgeführt, der einen Zusatz von 0,1 M $CaCl_2$ enthielt. Die Reaktion wurde nach einstündiger Inkubation bei 37°C durch schnelles Einfrieren gestoppt. 5 mg Do6/7 wurden mit 1 mg Enzym behandelt.

b) Behandlung mit Pronase

Die Behandlung wurde in 0,05 M Tris-Essigsäure-Ammoniak-Puffer pH 7,2 durchgeführt. Die Reaktion wurde nach einstündiger Inkubation bei 37°C durch schnelles Einfrieren gestoppt. 5 mg Do6/7 wurden mit 1 mg Pronase behandelt.

c) Behandlung mit Ribonuclease A

Die Behandlung wurde in 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde durch schnelles Einfrieren gestoppt. 5 mg Do6/7 wurden mit 0,1 mg Enzym behandelt.

d) Behandlung mit Ribonuclease T_1

Die Behandlung wurde in 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit einem Zusatz von 20 mM EDTA durchgeführt. Nach einstün-

diger Inkubation wurde durch schnelles Einfrieren gestoppt. 5 mg Do6/7 wurden mit 0,1 mg Enzym behandelt.

e) Behandlung mit Desoxyribonuclease I

Die Behandlung erfolgte in 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 mit einem Zusatz von 5 mM $MgSO_4$. Nach einstündiger Inkubation bei 25°C wurde durch schnelles Einfrieren die Reaktion gestoppt. 5 mg Do6/7 wurden mit 0,1 mg Enzym behandelt.

3.) Lösungsmittelgemische für die Dünnschichtchromatographie

Nr. 1: Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser = 14/3/15/8
Das System wurde selbst an die zu trennenden Substanzgemische angepaßt.

Nr. 2: Aceton/Eisessig/n-Butanol/5% Ammoniak/Wasser = 25/15/35/15/10 (37)

Nr. 3: Eisessig/n-Butanol/Wasser = 6/24/10 (37)

4.) Applikationsbedingungen bei der Vorbehandlung der Versuchstiere im biologischen Test

Die zu testende Fraktion wurde in PBS gelöst. Von dieser Lösung erhielten dann je 10 STU-Mäuse täglich 0,1 ml intraperitoneal injiziert. Der erste Tag der Vorbehandlung wurde mit Tag -6 bezeichnet, der zweite mit -5 usw. Am Tag 0 erfolgte die Transplantation der Tumorzellen. Von da an wurden die Tage positiv weiterbenannt. Die Behandlung dauerte noch bis zum Tag 3, das bedeutet, daß jedes Tier 1,0 ml der Testlösung erhalten hatte. Die Konzentrationen der Lösungen wurden der erwarteten spezifischen Aktivität der jeweiligen Fraktion angepaßt.

F) Literaturliste

1. Waksman, B.H. und Colley, D.G. in "Cell Interactions and Receptor Antibodies in Immune Responses" Proc. of the third Sigrid Jusélius Symposium, edited by O. Mäkelä A. Cross and T.U. Kosunen, Acad. Press inc. (London) ltd.
2. Miller, J.F.A.P. und Osoba, D., Physiol. Rev. 47, 437-520 (1967)
3. Everett, N.B und Tyler, R.W., Int. Rev. Cytol. 22, 205-237 (1967)
4. Osoba, D. in "Regulation of the Antibody Response" (B. Cinader ed.) 232-275. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
5. Schwarz, M.R., Ann. J. Anat. 121, 559-570 (1967)
6. Daguillard, F. und Richter, M., J. exp. Med., 130, 1187-1208 (1969)
7. Steffen, C. und Rosak, M., J. Immun. 90, 337-346 (1963)
8. Turk, J.L. in "Delayed Hypersensitivity" Frontiers of Biology Vol. 4v (1967), Neuberger, A. und Tatun, E.L. edit., North-Holland Publishing Company, Amsterdam
9. Arnason, B.G., De-Vaux, St-Cyr.C. und Relyveld, E.H., Int. Archs. Allergy appl. Immun. 25, 206-224 (1964)
10. Transpl. Rev. 1 (1969)
11. Staples, P.J., Gery, J. und Waksman, B.H., J.exp. Med., 124, 127-139 (1963)
12. Horiuchi, A. und Waksman, B.H., J. Immunol. 101, 1322-1332 (1968)
13. Levey, R.H., Trainin, N. und Law, L.W., J. Natl. Cancer Inst. 31, 199-206 (1963)
14. Osoba, D. und Miller, J.A.F.P., J. exp. Med. 119, 177- (1964)

15. Trench, C.A.H., Watson, S.W., Walker, F.C., Gardner, R.S. und Green, C.A., Immunol. 10, 187- (1966)
16. Trainin, N. und Small, M., J. exp. Med. 132, 885-897 (1970)
17. Umiel, T. und Trainin, N., Eur. J. Immunol. 5, 85-88 (1975)
18. "The biological Activity of thymic Hormones" Van Bekkum, D.W. edit., Kooyker Scientific Publications, Rotterdam
19. Goldstein, A.L., Guha, A., Zatz, M.M., Hardy, M.A. und White, A., P.N.A.S. 69, 1800-1803 (1972)
20. Goldstein, A.L. et al., P.N.A.S. 74, 725-729 (1977)
21. Goldstein, G., Nature 247, 11-14 (1974)
22. Schlesinger, D.H., Goldstein, G., Scheid, M.P. und Boyse, E.A., Cell 5, 367-370 (1975)
23. Twomey, J.J., Goldstein, G., Lewis, V.M., Bealmear, P.M. und Good, R.A., P.N.A.S. 74, 2541-2545 (1977)
24. Bach, J.-F., Dardenne, M. und Pleau, J.-M., Nature 266, 55-56 (1977)
25. Incefy, G.S., Dardenne, M., Pahwa, S., Grimes, E., Pahwa, R.N., Smithwick, E., O'Reilly, R. und Good, R.A., P.N.A.S. 74, 1250-1253 (1977)
26. Ströbel, G., Eur. J. Immunol. 4, 621-626 (1974)
27. Ströbel, G., unveröffentlicht
28. Wilhelm, N., Diplomarbeit, Tübingen 1975
29. Hellström, K.E. und Hellström, J., Adv. in Cancer Res. 12, 167-223 (1969)
30. Kaliss, N., Ann. N. Y. Acad. Sci. 101, 64-79 (1962)
31. Möller, G., J. Natl. Cancer Inst. 30, 1153-1175 (1963)
32. Bubenik, J. und Koldovsky, P., Folia Biol. (Prag) 12, 11-16 (1966)
33. Chard, J., Immunol. 14, 583-589 (1968)

34. Kurth, R. und Bauer, H., Eur. J. Immunol. 3, 95- (1973)
35. Comittee on Standardized Nomenclature for inbred strains of mice, fourth listing, Cancer Res. 28, 391- (1968)
36. Folkman, J., Scientific American 234, 59-73 (1976)
37. Wilson, G.B., Welch, T.M. und Fudenberg, H.H. in "Transfer Factor, Basic Properties and Clinical Applications" Asher, M.S. und Gottlieb, A.A. edit., Academic Press Inc. New York (1976)

Lebenslauf

Am 28. November 1947 wurde ich als Sohn des Schlossers Nikolaus Wilhelm und seiner Frau Elisabeth, geb. Weisheit in Langenau geboren. Von 1954 ab besuchte ich die Grundschule in Langenau und von 1958 das dortige Gymnasium. Ab Herbst 1963 besuchte ich das Kepler-Gymnasium in Ulm, wo ich im Oktober 1966 die Reifeprüfung ablegte. Nach einer 15-monatigen Bundeswehrzeit begann ich im Sommersemester 1968 mit dem Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Im April 1972 legte ich die Diplom-Vorprüfung und im Oktober 1974 die Diplom-Hauptprüfung ab. Von Oktober 1974 arbeitete ich am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. A. Anderer an meiner Diplomarbeit mit dem Thema "Biochemischer und biologischer Vergleich einer niedermolekularen biologisch aktiven Fraktion des Thymus mit den bekannten Thymushormonen". Diese Arbeit war im Oktober 1975 abgeschlossen und seither arbeitete ich an der selben Stelle an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herrn Professoren:

Biochemie: F.A.Anderer, U.Weber, U.Weser, G.Weitzel
Organische Chemie: E.Bayer, E.Müller, G.Opitz
Anorganische Chemie: W.Rüdorff, E.Stumpp
Physikalische Chemie: H.Mauser, D.Oelkrug
Mikrobiologie: H.Zähner
Mathematik: W.Schweizer
Physik: H.Krüger, H.Seiler

Botanik: E.Bünning, H.Metzner
Zoologie: K.G.Grell
Anatomie: K.Mörike

Polyfoto Vogt KG
Forstrasse 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/610641-42

Polyfoto Vogt KG
Forstrasse 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/610641-42